

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par **l'UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

Préparée au sein de l'école doctorale
Sciences des procédés – sciences des aliments
Et de l'unité de recherche UMR IATE - CIRAD

Spécialité : Biochimie, chimie des aliments

Présentée par **Erwann DURAND**

**SOLVANTS DE TYPE EUTECTIQUES
PROFONDS :**

**NOUVEAUX MILIEUX REACTIONNELS AUX
REACTIONS DE LIPOPHILISATION
BIOCATALYSEES PAR LES LIPASES ?**

Soutenue le 19 décembre 2013 devant le jury composé de

Mme Françoise ERGAN, Prof., Université du Maine, Laval	Rapporteur
Mr Frédéric CARRIERE, Dr., C.N.R.S., Marseille	Rapporteur
Mr Uwe T. BORNSCHEUER, Prof., Institut de biochimie, Greifswald	Examineur
Mr Robert LORTIE, Dr., NRC, Montréal	Examineur
Mr Thierry DURAND, Dr., IBMM-UM1, Montpellier	Président du jury
Mr Jérôme LECOMTE, Dr., UMR IATE-CIRAD, Montpellier	Examineur
Mr Pierre VILLENEUVE, Dr., UMR IATE-CIRAD, Montpellier	Directeur de thèse

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé entre octobre 2010 et septembre 2013 au sein du CIRAD dans l'unité mixte de recherche IATE, sous la direction du Dr. Pierre VILLENEUVE avec un co-encadrement du Dr. Jérôme LECOMTE.

Mes premiers remerciements de Docteur vont donc tout naturellement à ces 2 personnes, sans qui, cette aventure n'aurait pas été possible. Merci de m'avoir accueilli, de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis de vivre ces 3 années merveilleuses, aussi bien d'un point de vue professionnel que relationnel. Merci Pierre pour ton encadrement paternel lors de cette thèse et la confiance que tu as placée en moi, mais aussi pour ta bonne humeur, ton sourire et tous ces moments de partage qu'ils aient été professionnels, privés ou sportifs. Merci Jérôme pour ta justesse, ta rigueur scientifique, ta disponibilité et ton magnifique discours de fin de thèse.

Merci aux membres du jury (Prof. Françoise ERGAN, Prof. Frédéric CARRIERE, Prof. Uwe T. BORNSCHEUER, Dr. Robert LORTIE et le Dr. Thierry DURAND) pour m'avoir fait l'honneur et le privilège d'avoir accepté de consacrer du temps à la lecture de ce mémoire et pour toutes les remarques constructives apportées. Je n'oublie pas aussi les membres de mon comité de thèse (Prof. Eric DUBREUCQ, Dr. Elysée FERRE et Dr. Robert LORTIE) qui ont grandement participé aux contenus de ce manuscrit de thèse.

J'aimerais bien entendu adresser un remerciement général à toutes les personnes qui ont participé de près comme de loin à la réussite de cette thèse. Je pense entre autre à tous les résidents des bâtiments 37, 31 et 32, mais surtout à tous ceux qui ont partagé pendant ces trois années les labos, les bureaux, les couloirs, la cafet' ainsi que la terrasse du bâtiment 33 du campus de Supagro-INRA. Un grand et sincère merci à toute l'équipe des caoutchouteux, Laurent, Céline, Stéphane, Jérôme, Ingrid, Sébastien, Mélanie, Sophie et tous les étudiants (stagiaires et thésards) qui se sont succédés. Mais aussi Fred, pour avoir partagé les dépenses (et récompenses ?) de la team loto foot, Karim pour ta disponibilité jamais sans râler et toujours à l'écoute,

et enfin Christine pour ta gentillesse, ta délicatesse et le management de ma carrière cinématographique.

Le bon déroulement et la réussite de ce travail de thèse ont été en très grande partie dus aux soutiens et à la générosité de ma proche équipe de lipidos.

Merci aux secrétaires de Clara à Coco en passant par Valérie, pour votre efficacité remarquable.

Merci Marlène, pour ton bureau ;).

Merci Maria, pour m'avoir appris toutes les coutumes mexicaines.

Merci Michel, pour ton sourire si communicatif, ta connaissance et ton respect pour la science.

Merci au duo Erikaaaa et Claudia Grajeda Iglesias, pour toutes vos gentillesse.

Merci Nono, de m'avoir inculqué toutes ces « adaptabilités techniques » qui permettent à un bon chercheur de devenir un très bon chercheur. Merci aussi de m'avoir transmis le « coup de pied technique » quand plus aucune solution n'est envisageable.

Merci Nath ou devrais-je dire mon binôme ? pour tes aides précieuses et tes conseils justes et pertinents. En particulier, je retiendrai l'utilité et la nécessité du code couleur...

Merci Chris pour tout ce que tu as fait pour moi pendant ces années.

Merci Georges, mon terrible adversaire au ping-pong mais mon ami et mon complice dans la vie.

Enfin, j'adresse un grand merci à toutes celles et ceux qui m'ont épaulé pendant cette période (ou depuis plus longtemps encore). Tak Ann-Dorit, Gracias Dr. Erika Salas de l'*Universidad Autónoma* de Chihuahua, mes proches amis de longue date Nico & Mich' & l'Ohaime, sans oublier les plus récents, Guilherme mon pote Gaucho de Grémio pour ton assistance à la muscu, ton matelas et tes sombreros. Un merci aussi à tous les joueurs qui ont porté le maillot de l'AS CIRAD et avec qui j'ai pu remporter un titre de champion en 2012.

Pour terminer, je tiens à remercier toute ma famille que j'aime très fort, à commencer par mon papa et ma maman qui ont fait ce que je suis, mon petit frère et

ma grande sœur, mais aussi mon beauf' qui est grandement responsable du bonheur que j'ai d'être le tonton d'un petit Jesse.

Enfin, je tiens à remercier celle qui partage ma vie depuis plusieurs années. Merci pour tout ce que tu es, et tout ce que tu m'apportes au quotidien. Tu partages mes joies et mes rires aussi bien que mes peines et mes problèmes et c'est pour ça que je t'aime si fort.

Table des matières

TRAVAUX RELATIFS A CETTE THESE	9
LISTE DES FIGURES	12
LISTE DES TABLEAUX.....	16
LISTE DES ABREVIATIONS	18

INTRODUCTION GENERALE

CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction

1. GENERALITES SUR LES MELANGES EUTECTIQUES PROFONDS	25
1.1 : DEFINITION	25
1.2 : SYNTHESE DES MEP.....	28
1.3 : PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	30
1.3.1 : Point de fusion.	30
1.3.2 : Viscosité, tension de surface, conductivité et densité.....	34
1.3.3 : Acidité et alcalinité.	38
1.3.4 : Stabilité thermique et polarité.....	39
1.3.5 : Toxicité, biodégradabilité et dangerosité	40
1.4 : PROPRIETES DE SOLVATATION	41
1.4.1 : Miscibilité des mélanges eutectiques profonds avec les solvants organiques.....	41
1.4.2 : Miscibilité des mélanges eutectiques profonds avec l'eau	42
2 . UTILISATION DES MELANGES EUTECTIQUES PROFONDS COMME SOLVANTS	43
2.1 : DANS LES PROCEDES ELECTROCHIMIQUES	43
2.2 : POUR LA PREPARATION DE MATERIAUX INORGANQUES	44
2.3 : DANS LES PROCEDES DE SEPARATION, DE SOLUBILISATION ET D'EXTRACTION	45
2.3.1 : Dissolution de gaz (CO_2 et SO_2).....	45
2.3.2 : Solubilisation de principe actif, oxyde de métal et autres molécules.	46
2.3.3 : Solvants dans les procédés d'extraction ou de séparation	48
2.4 : SOLVANTS ET/OU CATALYSEURS EN SYNTHESE ORGANIQUE.....	50
2.5 : DANS LES BIOPROCEDES	54
2.5.1 : En pharmacologie	54
2.5.2 : Dans les réactions enzymatiques (protéase, époxysynthase ou estérase).....	54
2.5.3 : Dans les réactions biocatalysées par les lipases	57

3. LIOPHILISATION BIOCATALYSEE PAR LES LIPASES	61
3.1 : GENERALITES SUR LES LIPASES	61
3.2 : PARAMETRES INFLUENÇANT LA REACTIVITE LIPASIQUE	67
3.2.1 : <i>Le milieu réactionnel</i>	67
3.2.2 : <i>L'activité thermodynamique de l'eau (a_w)</i>	76
3.2.3 : <i>Le pH</i>	80
3.2.4 : <i>La température</i>	81
3.2.5 : <i>Nature des substrats</i>	83
3.2.6 : <i>Additifs et autres facteurs physiques</i>	85
3.3 : REACTION DE LIOPHILISATION BIOCATALYSEE PAR LES LIPASES.....	87
3.3.1 : <i>L'enjeu des réactions dites de lipophilisation</i>	87
3.3.2 : <i>Lipophilisation de composés phénoliques biocatalysées par des lipases</i>	90

CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES

1 : MATERIELS	94
1.1 : SOLVANTS ET REACTIFS	94
1.2 : SUBSTRATS MIS EN ŒUVRE	96
1.3 : BIOCATALYSEURS	97
2 : METHODES	99
2.1 : SYNTHÈSE DES SOLVANTS DE TYPE MEP (MELANGE EUTECTIQUE PROFOND).....	99
2.1.1 <i>Synthèse des mélanges eutectiques binaires</i>	100
2.1.2 <i>Synthèse des mélanges ternaires ChCl:Eau:Urée</i>	101
2.2 : BROYAGE DU BIOCATALYSEUR NOVOZYM435 (ICALB)	102
2.3 : DETERMINATION DE LA TENEUR EN EAU	102
2.4 : DETERMINATION DU PH.....	102
2.5 : DETERMINATION DE L'ACTIVITE THERMODYNAMIQUE DE L'EAU (A_w)	102
2.6 : SYNTHÈSE ET PURIFICATION DES ESTERS METHYLIQUES DES ACIDES PHENOLIQUES	103
2.7 : CONDITIONS GENERALES DE TRANSESTERIFICATION.....	104
2.7.1 <i>Avec le laurate de vinyle comme substrat donneur d'acyle</i>	104
2.7.2 <i>Avec les composés phénoliques comme substrats donneurs d'acyle</i>	104
2.8 : MESURE DE L'ACTIVITE RESIDUELLE DE L'ENZYME	105
2.8.1 <i>Avec le laurate de vinyle comme substrat donneur d'acyle</i>	105
2.8.2 <i>Avec les composés phénoliques comme substrats donneurs d'acyle</i>	105
2.9 : TECHNIQUES ANALYTIQUES.....	106

2.9.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)	106
2.9.2 Chromatographie en phase gazeuse	106
2.9.3 Chromatographie en phase liquide.....	107
2.9.4 Spectroscopie UV.....	108
2.9.5 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC-MS) :	109
2.9.6 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) :	109
2.10 : DEFINITION DES CALCULS.....	109

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

PARTIE 1. SCREENING DES MELANGES EUTECTIQUES PROFONDS COMME MILIEUX REACTIONNELS POUR DES REACTIONS BIOCATALYSEES PAR LA LIPASE B DE *CANDIDA ANTARCTICA* (ICALB) 112

1.1 : REACTION D'ALCOOLYSE DU LAURATE DE VINYLE	112
1.1.1 : Conditions générales et présentation de la réaction	112
1.1.2 : Alcoololyse du laurate de vinyle avec des alcools de différentes longueurs de chaîne.....	117
1.1.3 : Réactivité du donneur de liaison hydrogène du MEP	119
1.1.4 : Etudes comparatives des activités spécifiques de ICALB dans ChCl:U, ChCl:Gly et le toluène.	125
1.1.5 : Activité résiduelle de la lipase ICALB dans ChCl:U et ChCl:Gly	127
1.1.6 : Conclusion.....	129

PARTIE 2. UTILISATION DE CHCL:U ET CHCL:GLY POUR LA LIPOPHILISATION DE COMPOSES PHENOLIQUES. 131

2.1 : REACTION D'ALCOOLYSE DE COMPOSES PHENOLIQUES AVEC LE 1-OCTANOL.....	131
2.1.1 : Conditions générales et présentation de la réaction	131
2.1.2 : Mise au point de la méthode analytique	132
2.1.3 : Alcoololyse du p-coumarate de méthyle dans ChCl:U et ChCl:Gly	134
2.1.4 : Alcoololyse du p-coumarate de méthyle dans ChCl:U, en mélange avec de l'eau.....	135
2.1.5 : Alcoololyse du p-coumarate de méthyle dans ChCl:Gly en mélange avec de l'eau	138
2.1.6 : Alcoololyse du férulate de méthyle dans ChCl:U et ChCl:Gly en mélange avec de l'eau.....	139
2.1.7 : Conclusion sur l'alcoololyse des composés phénoliques dans les MEP.....	141
2.2 : EFFET DE LA TENEUR EN EAU SUR LES PROPRIETES FONCTIONNELLES DU MILIEU REACTIONNEL	143
2.2.1 : Effet de la teneur en eau sur l'activité thermodynamique (a_w) du milieu réactionnel.....	143
2.2.2 : Effet de la teneur en eau sur le pH du milieu réactionnel.....	145
2.2.3 : Effet de la teneur en eau sur l'activité résiduelle de la lipase	148
2.2.4 : Conclusions sur l'effet de la teneur en eau dans le milieu réactionnel	150
2.3 : ALCOOLYSE DU P-COUMARATE DE METHYLE AVEC LE 1-OCTANOL BIOCATALYSEE PAR ICALB DANS DIFFERENTS MELANGES MEP-EAU.....	151

2.4 : ALCOOLYSE DU <i>P</i> -COUMARATE DE METHYLE AVEC LE 1-OCTANOL, BIOCATALYSEE PAR DIFFERENTES LIPASES COMMERCIALES, DANS CHCl:U EN ASSOCIATION AVEC DE L'EAU	154
--	-----

PARTIE 3. COMPREHENSION DE L'ORGANISATION DU MELANGE TERNAIRE CHCl:EAU:U, EN VUE DE L'OPTIMISATION DES CONDITIONS DE LIOPHILISATION PAR LA LIPASE B DE <i>CANDIDA ANTARCTICA</i> (ICALB)	158
3.1. CONTEXTE	158
3.2. : MESURE DE L'ACTIVITE THERMODYNAMIQUE ET INTENSITE DE VIBRATION DE FLEXION DE L'EAU ASSOCIEE AU CHLORURE DE CHOLINIUM	159
3.3. : MESURE DE L'ACTIVITE THERMODYNAMIQUE DE L'EAU (A_w) DANS LE MELANGE TERNAIRE CHCl:EAU:U	161
3.4. : STABILITE DE LA LIPASE B IMMOBILISEE DE <i>CANDIDA ANTARCTICA</i> (ICALB) DANS UN MELANGE TERNAIRE CHCl:EAU:U ..	163
3.5. : MESURE DES ACTIVITES D'ALCOOLYSE ET D'HYDROLYSE DANS LES REACTIONS CATALYSEES PAR LA LIPASE EN MELANGE TERNAIRE CHCl:EAU:U	164
3.6. : INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ALCOOL SUR LES RENDEMENTS D'ALCOOLYSE	166
3.7. : CONDITIONS DE REACTIONS OPTIMALES POUR FAVORISER LES REACTIONS D'ALCOOLYSE DE COMPOSES PHENOLIQUES EN CATALYSE LIPASIQUE DANS CHCl:EAU:U	168
3.8. : CONCLUSION	169

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

ANNEXES

1 : COMPOSITIONS ET TEMPERATURES DE FUSION DES MELANGES EUTECTIQUES PROFONDS.....	175
2 : COMPOSITIONS ET CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES NADES	179
3 : COMPOSITIONS ET TEMPERATURES DE FUSION DE DIFFERENTS LTTM	180

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Travaux relatifs à cette thèse

Publications sur les MEP :

- 1.) Erwann DURAND, Jérôme LECOMTE, Bruno BAREA, Georges PIOMBO, Eric DUBREUCQ, Pierre VILLENEUVE, **Evaluation of deep eutectic solvents as new media for *Candida antarctica* B lipase catalyzed reactions.** Process Biochem., **2012**, 47, 2081-2089.
- 2.) Erwann DURAND, Jérôme LECOMTE, Pierre VILLENEUVE, **Deep eutectic solvents: Synthesis, application and focus on lipase-catalyzed reactions**, Eur. J. Lipid Sci. Technol., **2013**, 115, 379-385.
- 3.) Erwann DURAND, Jérôme LECOMTE, Bruno BAREA, Eric DUBREUCQ, Robert LORTIE, Pierre VILLENEUVE, **Evaluation of deep eutectic solvent-water binary mixtures for lipase-catalyzed lipophilization of phenolic acids**, Green Chem., **2013**, 15, 2275-2282.
- 4.) Erwann DURAND, Jérôme LECOMTE, Bruno BAREA, Pierre VILLENEUVE, **Towards a better understanding of how to improve lipase-catalyzed reactions using deep eutectic solvents based on choline chloride**, Eur. J. Lipid Sci. Technol., **2014**, 116, 16-23.

Publications en collaboration :

- 5.) Chahinez AOUF, Erwann DURAND, Jérôme LECOMTE, Maria-Cruz FIGUEROA-ESPINOZA, Eric DUBREUCQ, Hélène FULCRAND, Pierre VILLENEUVE, **The use of lipases as biocatalysts for the epoxidation of fatty acids and phenolic compounds**, Green Chem., accepté, **2014**.

6.) Christelle BAYRASY, Erwann DURAND, Julien FERNANDEZ, Jérôme LECOMTE, Mickael LAGUERRE, Thierry DURAND, Chantal CABELLO, Pierre VILLENEUVE, **Synthesis and Antiradical Properties of Novel Diacylglycerols Rosmarinate Conjugates**, Biochem., soumis, 2014.

7.) Mercedes ALEMAN, Ricard BOU, Francesc GUARDIOLA, Erwann DURAND, Pierre VILLENEUVE, Charlotte JOCOBSEN, Ann-Dorit Moltke SORENSEN, **Antioxidative effect of lipophilized caffeic acid in fish oil enriched mayonnaise and milk**, Food Chem., soumis, 2014.

8.) Nathalie BAROUH, Erwann DURAND, Bruno BAREA, Pierre VILLENEUVE, **Esterification of phenolic acids by generated in situ a catalytic gaseous HCl**, tetrahedron Lett., en préparation, 2014.

Communications orales à des congrès internationaux

1.) Erwann DURAND, Jérôme LECOMTE, Pierre VILLENEUVE

Deep eutectic solvents: New media for lipase-catalyzed reactions

Symposium on Biocatalysis in Lipid Modifications, 19-21 Septembre 2012. Greifswald, Germany.

2.) Erwann DURAND, Jérôme LECOMTE, Pierre VILLENEUVE

Deep eutectic solvents: New media for lipase-catalyzed reactions

10th Euro Fed Lipid Congress, 23-26 Septembre 2012, Cracovie, Pologne.

3.) Erwann DURAND, Jérôme LECOMTE, Pierre VILLENEUVE

Deep eutectic solvents: New media for lipase-catalyzed reactions

104RD AOCS Annual Meeting & Expo. 28 Avril – 1 Mai 2013. Montréal, Québec, Canada.

Communications affichées à des congrès internationaux

1.) Erwann DURAND, Jérôme LECOMTE, Bruno BAREA, Georges PIOMBO, Pierre VILLENEUVE

Deep eutectic solvents: New media for lipase-catalyzed reactions

103RD AOCS Annual Meeting & Expo. 29 Avril – 2 Mai 2012. Long Beach (CA), USA.

Liste des figures

Figure 1 : Diagramme de phase caractéristique d'un MEP.....	28
Figure 2 : Extraction du glycérol issu de la préparation du biodiesel par formation d'un MEP	48
Figure 3 : Synthèse (condensation du type Knoevenagel) de différents chromophores en MEP	51
Figure 4 : Réaction multicomposant du type Biginelli dans le MEP acide L-tartrique:DMU (Gore <i>et al.</i> , 2011).	52
Figure 5 : Mécanisme réactionnel de la lipase	64
Figure 6 : Les différentes techniques d'immobilisation d'enzymes (Buchholz K, Kasche V, Bornscheuer UT, 2005).	66
Figure 7 : Diversité structurale des cations constituant les liquides ioniques.....	71
Figure 8 : Diversité des anions constituant les liquides ioniques.	71
Figure 9 : Diagramme de phase du dioxyde de carbone.....	75
Figure 10 : Exemples de lipophilisations d'acides (poly)phénoliques.	89
Figure 11 : Réaction d'alcoolyse du laurate de vinyle ($R^1=C_{11}H_{23}$) avec des alcools de différentes longueurs de chaînes ($R^2= C_4H_9$, C_8H_{17} ou $C_{18}H_{37}$)	113
Figure 12 : Structure des molécules utilisées pour la synthèse des MEP.....	114
Figure 13 : Pourcentage massique en eau dans les MEP (ChCl:U et ChCl:Gly) après 26 jours d'incubation sous atmosphère à a_w contrôlée par différentes solutions aqueuses saturées en sel (a_w 0,11 = LiCl, a_w 0,22 = CH_3COOK , a_w 0,44 = K_2CO_3 , a_w 0,75 = NaCl).....	116
Figure 14 : Fragmentation de l'éthylène glycol mono laurate en spectrométrie de masse (GC/EI-MS).	120
Figure 15 : Fragmentation de l'éthylène glycol di laurate en spectrométrie de masse (GC/EI-MS).....	120
Figure 16 : Fragmentation du mono octyle oxalate en spectrométrie de masse (GC/EI-MS).....	122

Figure 17 : Fragmentation du di octyle oxalate en spectrométrie de masse (GC/EI-MS).....	122
Figure 18 : Fragmentation du mono octyle malonate en spectrométrie de masse (GC/EI-MS).....	123
Figure 19 : Fragmentation du di octyle malonate en spectrométrie de masse (GC/EI-MS).....	123
Figure 20 : Fragmentation du mono octadécyle malonate en spectrométrie de masse (GC/EI-MS).....	124
Figure 21 : Mesure des activités spécifiques pour les réactions d'alcoolyse du laurate de vinyle en utilisant différents alcools primaires dans ChCl:U, ChCl:Gly et le toluène à 60°C. Laurate de vinyle (40µmol), alcools (240µmol), iCALB (1mg), solvant (1ml).....	125
Figure 22 : Activité spécifique de iCALB dans la réaction d'alcoolyse du laurate de vinyle par le 1-octanol dans ChCl:U et ChCl:Gly à 40°C, 50°C et 60°C. Laurate de vinyle (40µmol), 1-octanol (240µmol), iCALB (1mg), solvant (1ml).	126
Figure 23 : Mesure de l'activité spécifique résiduelle après 1, 2, 3 ou 5 jours d'incubation, sur la réaction d'alcoolyse du laurate de vinyle par le 1-octanol dans ChCl:U, ChCl:Gly et le toluène à 50°C. Laurate de vinyle (40µmol), 1-octanol (240µmol), iCALB (1mg), solvant (1ml).	129
Figure 24 : Réaction d'alcoolyse du <i>p</i> -coumarate de méthyle par le 1-octanol par catalyse lipasique.....	132
Figure 25 : Présentation de la chromatographie à interactions hydrophiles (HILIC).	133
Figure 26 : Alcoolyse du <i>p</i> -coumarate de méthyle avec le 1-octanol dans ChCl:U en mélange avec l'eau: Conversion, rendement et hydrolyse en fonction de la teneur en eau après 72 h de temps de réaction (60°C, 40mM de <i>p</i> -coumarate de méthyle, 240mM de 1-octanol, 10 mg.ml ⁻¹ iCALB). Les valeurs sont des moyennes issues de 2 répétitions.	136
Figure 27 : Les différents équilibres thermodynamique lors de la réaction d'alcoolyse du <i>p</i> -coumarate de méthyle avec le 1-octanol dans ChCl:U en mélange avec l'eau..	138
Figure 28 : Alcoolyse du <i>p</i> -coumarate de méthyle avec le 1-octanol dans ChCl:Gly en mélange avec l'eau: Conversion, rendement et hydrolyse en fonction de la teneur en eau après 725 h de temps de réaction (60°C, 40mM de <i>p</i> -coumarate de méthyle,	

240mM de 1-octanol, 10 mg.ml ⁻¹ iCALB). Les valeurs sont des moyennes issues de 2 répétitions.	139
Figure 29 : Alcoolyse du férulate de méthyle avec le 1-octanol dans ChCl:Gly et ChCl:U en mélange avec de l'eau: Conversion et rendement dans ChCl:U après 168 h. Conversion et rendement dans ChCl:Gly après 412 h. (60°C, 40mM de férulate de méthyle, 240mM de 1-octanol, 10 mg.ml ⁻¹ iCALB). Les valeurs sont des moyennes issues de 2 répétitions.	140
Figure 30 : Activité thermodynamique de l'eau (a_w) et activité spécifique de la lipase (correspond à la quantité de substrat transformée par heure et par mg d'enzyme à 60°C) en fonction de la teneur en eau dans ChCl:Gly ou ChCl:U. Activité spécifique dans ChCl:Gly et ChCl:U, a_w ChCl:Gly et a_w ChCl:U. Les valeurs sont des moyennes de 2 répétitions.....	144
Figure 31 : pH mesuré dans ChCl:Gly et ChCl:U en mélange avec de l'eau. Les valeurs sont des moyennes de 3 répétitions.....	146
Figure 32 : Formules développées de l'urée (U) et de ses deux dérivés, la N-méthyle urée (MeU) et l'acétamide (Acet).....	147
Figure 33 : Temps de demi-vie de iCALB (jours) mesuré sur l'alcoolyse du <i>p</i> -coumarate de méthyle (40 mM) par le 1-octanol (240 mM) à 60°C (ratio 1 :6) dans ChCl:Gly et CHCl:U en mélange avec de l'eau. Les valeurs sont des moyennes de 3 répétitions.....	150
Figure 34 : Les différents donneurs de liaison hydrogène utilisés dans la synthèse de MEP à base de chlorure de cholinium (ChCl).....	152
Figure 35 : Conversion, hydrolyse, et rendement lors de l'alcoolyse du <i>p</i> -coumarate de méthyle avec le 1-octanol (1:6) à 60°C dans ChCl:U en association (ou non) avec de l'eau biocatalysé par iCALB sous sa forme native ou immobilisée après 72 heures.	157
Figure 36 : Activité thermodynamique et intensité de la vibration de flexion de l'eau associée à une mole de ChCl. L'aire a été mesurée à partir du pic de vibration de flexion de l'eau à 1630 cm ⁻¹ en utilisant la spectroscopie IR-TF.....	159
Figure 37 : Activité thermodynamique (a_w) en fonction de la quantité massique en eau dans un mélange ternaire ayant 1 mole de ChCl et x mole(s) d'urée (x=0, 0.5, 1, 2 et 3).	161

Figure 38 : Demi-vie de la lipase iCALB à 60°C dans différents mélanges ternaires ChCl:Eau:U contenant 1 mol de ChCl. La quantité d'eau varie de 1, 1,5, 2, 3 et 4 mol et celle de l'urée de 0, 0,5, 1, 2 et 3 mol)..... 163

Figure 39 : Conversion du *p*-coumarate de méthyle (40 mM) et rendement d'hydrolyse dans la réaction d'alcoololyse avec le 1-octanol (ratio 1 :6) à 60°C en présence d'iCALB. Différents mélanges ternaires ChCl:Eau:U contenant 1 mol de ChCl ont été testés. La quantité d'eau varie de 1, 1,5, 2, 3 et 4 mol et celle de l'urée de 0,5, 1, 2 et 3 mol..... 165

Figure 40 : Conversion du *p*-coumarate de méthyle (40 mM) et rendement d'hydrolyse de la réaction d'alcoololyse à 60°C en utilisant iCALB comme biocatalyseur et différents excès molaires d'alcools 1:3, 1:6 et 1:12. La composition molaire du mélange ternaire ChCl:Eau:U utilisée était de 1:1.5:2. 167

Figure 41 : Conversion du composé phénolique (40 mM) et rendement d'hydrolyse de la réaction d'alcoololyse à 60°C en utilisant iCALB, avec différentes longueurs de la chaîne alkyle de l'alcool 1-butanol, 1-octanol, 1-dodécanol et 1-hexadécanol. Les compositions molaires des mélanges ternaires de ChCl:Eau:U sont respectivement de 1:1.5:2 et 1:2:2 pour le *p*-coumarate et férulate méthyle..... 169

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition et ratio molaire de quelques NADES (Choi <i>et al.</i> , 2011).....	27
Tableau 2 : Température de fusion et ratio molaire à l'eutectique de MEP à base de ChCl et différents DLH.....	32
Tableau 3 : Température de fusion et ratio molaire à l'eutectique de MEP à base de ChCl et d'acides dicarboxyliques.....	32
Tableau 4 : Température de fusion et ratio molaire à l'eutectique de MEP à base d'urée et divers sels cationique ayant le même contre ion chlorure.....	33
Tableau 5 : Température de fusion et ratio molaire à l'eutectique de MEP à base de cholinium et d'urée et se différenciant par la nature du contre ion anionique.....	34
Tableau 6 : Composition et viscosité de différents MEP. TA=température ambiante.	36
Tableau 7 : Conductivité et densité de plusieurs MEP. TA=température ambiante. .	38
Tableau 8 : Polarité de plusieurs MEP obtenue en utilisant le concept Reichardt's Dye 30.....	40
Tableau 9 : Conversion du valérate d'éthyle dans des MEP à 60°C en présence de divers enzymes.	58
Tableau 10 : Activité de iCALB lors de la transestérification du sorbate d'éthyle avec le butanol, dans différents MEP à 50°C.....	59
Tableau 11 : LogP des principaux solvants utilisés en synthèse lipasique	69
Tableau 12 : Lipophilisation enzymatique (lipase) d'acides phénoliques. S=solvant, T=température, RM=ratio molaire et E=enzyme.....	92
Tableau 13 : Référence des solvants et réactifs chimiques fournis par Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France).....	95
Tableau 14 : Référence et structure des substrats fournis par Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France).....	96
Tableau 15 : Référence des lipases fournis par Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France).....	97
Tableau 16 : Préparation des MEP.	100

Tableau 17 : Préparation des mélanges ternaires.....	101
Tableau 18 : Temps de rétention en CPG des substrats et produits de la réaction de transestérification du laurate de vinyle.....	107
Tableau 19 : Gradient d'élution en HPLC pour la séparation et l'analyse des réactions.....	107
Tableau 20 : Temps de rétention en HPLC des substrats et produits de la réaction de transestérification d'ester d'acides phénoliques.....	108
Tableau 21 : Composition et ratio molaire des différents MEP synthétisés.....	114
Tableau 22 : Pourcentage massique en eau déterminé des MEP immédiatement après leur synthèse.....	117
Tableau 23 : Conversion du laurate de vinyle dans les réactions d'alcoolyse en utilisant différents alcools primaires dans plusieurs MEP et dans le toluène à 60°C pendant 16 heures. Laurate de vinyle (40µmol), alcools (240µmol), iCALB (1mg), solvant (1ml).....	118
Tableau 24 : pH et activités spécifiques enzymatiques dans les MEP ChCl:U, ChCl:MeU et ChCl:Acet avec différentes quantités d'eau.	148
Tableau 25 : Activités spécifiques de iCALB (10mg/ml) dans différents MEP en association (ou non) avec de l'eau, dans l'alcoolyse du <i>p</i> -coumarate de méthyle avec le 1-octanol à 60°C (ratio 1:6).	153
Tableau 26 : Activité de différentes lipases commerciales dans ChCl:U en association (ou non) avec de l'eau dans la réaction d'alcoolyse du <i>p</i> -coumarate de méthyle avec le 1-octanol (1:6) à 60°C après 72 heures.....	155
Tableau 27 : Compositions et températures de fusion des MEP extraits de la Littérature.....	178
Tableau 28 : Compositions et caractéristiques physico-chimiques des NADES.	179
Tableau 29 : Compositions et températures de fusion des LTTM extraits de la Littérature.....	181

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
a_w	Activité thermodynamique de l'eau
CCM	Chromatographie sur couche mince
ChCl	Chlorure de cholinium
CHCl_3	Chloroforme
ChCOAc	Acétate de cholinium
CO_2	Dioxyde de carbone
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.5]undéc-7-ène
DLH	Donneur de liaison(s) hydrogène
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DSC	Calorimétrie différentielle à balayage
IR-TF	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
HILIC	Chromatographie à interactions hydrophiles
HMF	Hydroxyméthylfurfural
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
HRE	Humidité relative à l'équilibre
iCALB	Lipase B immobilisée de <i>Candida antarctica</i>
LI	Liquide(s) ionique(s)
LTTM	Low transition temperature mixture(s)
MeOH	Méthanol
MEP	Mélange(s) eutectique(s) profond(s)

Liste des abréviations

MSR	Méthodologie de surfaces de réponses
NADES	Natural deep eutectic solvent(s)
pH	Potentiel hydrogène
ScCO ₂	Dioxyde de carbone à l'état supercritique
SO ₂	Dioxyde de soufre
THF	Tétrahydrofurane
UV	Ultraviolet

INTRODUCTION GENERALE

Dans un contexte de chimie verte, les liquides ioniques sont considérés actuellement comme de possibles substituts aux solvants organiques classiques pour des réactions de synthèses chimiques ou biocatalysées. Néanmoins, si ces liquides ioniques semblent très prometteurs en raison de leur non-volatilité, de leur stabilité thermique et de leur capacité à solubiliser une large gamme de molécules de polarités variées, un certain nombre de difficultés apparaît lorsqu'il s'agit d'envisager leur développement au-delà de l'échelle du laboratoire. En effet, outre leur préparation qui reste relativement complexe, les liquides ioniques sont très onéreux. D'autre part, leur non toxicité jusqu'alors mise en avant pour justifier leur emploi est depuis peu remise en question.

Très récemment, les solvants de type « mélanges eutectiques profonds (MEP) » ont été décrits comme une alternative sérieuse et économiquement plus réaliste aux liquides ioniques. En effet, ces solvants qui consistent en un mélange d'un sel organique (ammonium ou phosphonium) et d'un donneur de liaison hydrogène peuvent également être liquides à température ambiante, non volatils et présentent une excellente stabilité thermique. De plus, contrairement aux liquides ioniques, ces nouveaux solvants sont très facilement préparés et leur innocuité ainsi que leur biodégradabilité sont sensiblement améliorées.

Dans le domaine des procédés enzymatiques, si la biocatalyse en milieu liquide ionique est très documentée, il n'existe que très peu de publications décrivant des réactions de biotransformation en MEP. Concernant les lipases en particulier, outre leurs applications dans le biofaçonnement des corps gras, ces enzymes sont également utilisées dans des réactions dites de lipophilisation pour la synthèse de nouvelles molécules à haute valeur ajoutée (tensioactifs, antioxydants lipophilisés).

Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse ont été d'évaluer le potentiel des MEP en tant que nouveaux milieux réactionnels « verts » pour la synthèse lipasique de

molécules à haute valeur ajoutée. Ainsi, les objectifs de cette étude pouvaient se décliner ainsi :

- Evaluer l'efficacité de différents mélanges eutectiques pour la synthèse enzymatique.
- Etudier l'aptitude de différentes lipases à catalyser des réactions de synthèse en MEP.
- Evaluer leur activité et leur stabilité enzymatique dans ces milieux.
- Maîtriser les différents paramètres réactionnels afin de favoriser la synthèse enzymatique dans les MEP sélectionnés.

Ce manuscrit comporte trois chapitres. Le premier est une étude bibliographique détaillant les MEP, leurs synthèses, leurs propriétés physico-chimiques et leurs utilisations comme solvant dans différentes applications. Dans ce premier chapitre, une étude bibliographique sur les lipases et les paramètres influençant leurs réactivités, en particulier dans des réactions dites de lipophilisation, sera décrit. Le second chapitre fera le descriptif des techniques utilisées pour la synthèse des MEP, la détermination des paramètres physico-chimiques, les conditions générales pour l'estérification ou la transestérification et enfin la présentation des conditions analytiques utilisées lors de ces travaux de thèse. Le dernier chapitre est consacré à la présentation de l'ensemble des résultats obtenus et à leurs discussions. La première partie a pour objectif le screening des MEP comme milieux réactionnels pour des réactions biocatalysées par la lipase B de *Candida antarctica*. La seconde traite de l'utilisation de ces milieux pour la lipophilisation de composés phénoliques. Enfin, la dernière partie a pour objectif de comprendre comment est structuré ce milieu réactionnel et comment les réactants peuvent influencer sur les réactions mises en jeu dans ce solvant.

Enfin ce mémoire se clôt classiquement par une conclusion soulignant les principaux résultats obtenus au cours de ses travaux ainsi que les perspectives d'études qui en découlent.

CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction

Au sens large, un solvant est une substance, qui, liquide à sa température d'utilisation, peut offrir la possibilité de dissoudre, solubiliser, diluer ou encore extraire une autre substance. Ainsi, les solvants sont d'une importance considérable dans la plupart des secteurs d'activités. Ils peuvent être utilisés comme agents de nettoyage, comme diluants dans la peinture, comme supports de conditionnement dans le secteur cosmétique ou bien encore comme milieux réactionnels en synthèses chimiques dans lesquelles leur rôle peut être primordial. A l'heure actuelle, les solvants peuvent être classés en fonction du type de liaisons chimiques qu'ils mettent en jeu.

Les solvants les plus couramment utilisés sont de nature moléculaire (ex : les solvants organiques). Ils sont essentiellement constitués d'une seule espèce neutre possédant exclusivement des liaisons covalentes.

Un autre type de solvant, toutefois moins répandu, correspond aux liquides atomiques tels que le mercure ou les alliages d'alcalins, siège de liaisons métalliques.

Plus récemment, de nouveaux solvants où prédominent des interactions ioniques ont été développés. Ces liquides ioniques, qui résultent de la combinaison de deux molécules chargées (cation/anion) organiques et/ou inorganiques, correspondent à des sels liquides se différenciant de l'ensemble des sels fondus par une température de fusion inférieure à 100°C.

Enfin, au début des années 2000, l'équipe du Prof. Andrew P. Abbott (Université de Leicester, Angleterre) s'est intéressée à synthétiser, à caractériser et à développer un nouveau type de solvant : les solvants eutectiques profonds (MEP). Ces liquides s'obtiennent en mélangeant une molécule neutre, donneuse de liaison(s) hydrogène, avec un sel organique chargé positivement et possédant un contre ion chargé négativement.

Quelle que soit l'application envisagée, le choix du solvant est fondamental et peut aisément constituer un facteur limitant. C'est le cas dans le domaine de la biocatalyse pour lequel le choix du milieu réactionnel influence grandement l'efficacité des réactions mises en jeu. Concernant la lipophilisation par des chaînes aliphatiques de molécules dites « polaires » comme les sucres ou les acides (poly)phénoliques par exemple, il s'avère que les réactions biocatalysées par les lipases sont souvent limitées en terme de rendement et que les cinétiques obtenues sont particulièrement lentes. Ces complications sont principalement dues à la différence de polarités des deux substrats impliqués et à la difficulté de trouver un milieu réactionnel approprié permettant leur solubilisation (Villeneuve, 2007). Outre ces propriétés de solvation, le solvant peut avoir également un impact direct sur l'activité catalytique d'une enzyme. Ainsi, il existe un dilemme technique dans le choix d'un système réactionnel enzymatique efficace dans lequel un substrat polaire (composés phénoliques par exemple) et apolaire (un alcool à longue chaîne par exemple) auront à la fois une grande solubilité et où les enzymes maintiendront une bonne activité. En effet, dans des solvants non polaires (comme l'hexane) les composés phénoliques ont une solubilité très faible, mais l'enzyme est active alors qu'inversement dans les solvants polaires dans lesquels ils ont une bonne solubilité, la plupart des lipases sont désactivées et présentent une faible activité.

Au-delà de ces contraintes « réactionnelles », d'autres paramètres sont à prendre en considération dans le choix des procédés. Depuis les débuts des années 1990 et l'émergence de la « chimie verte », il est indispensable de concevoir de nouveaux procédés permettant de réduire ou d'éliminer l'usage ou la génération de substances néfastes pour l'environnement. L'objectif est de minimiser, les dangers et de maintenir, voire d'augmenter l'efficacité de certaines pratiques chimiques. A ce titre l'utilisation de nouveaux milieux réactionnels autres que les solvants moléculaires dérivés des énergies fossiles, est d'un intérêt grandissant. Ainsi, les liquides ioniques sont très vite apparus comme une alternative de choix. Cependant, le coût et les difficultés de synthèse de ces liquides associés à une toxicité et une biodégradabilité fortement remises en cause aujourd'hui, limitent considérablement leur utilisation (Zhao *et al.*, 2007; Thuy Pham *et al.*, 2010). Pour remédier à ces inconvénients, tout en

conservant les propriétés avantageuses de ces liquides, les solvants eutectiques profonds ont connu ces dernières années un intérêt croissant (Zhang *et al.*, 2012). Tout comme les liquides ioniques, ces mélanges possèdent un point de fusion proche de la température ambiante, une faible volatilité et une grande stabilité thermique. En revanche, contrairement à la plupart des liquides ioniques, ces milieux sont relativement peu coûteux, très faciles à synthétiser et d'une excellente biodégradabilité.

Après avoir présenté les mélanges de type eutectique profond, leurs caractéristiques générales, leurs propriétés de solvation et leurs différentes applications, ce chapitre bibliographique traitera du problème de leur utilisation en tant que milieux réactionnels pour des réactions enzymatiques catalysées par les lipases.

1. GENERALITES SUR LES MELANGES EUTECTIQUES PROFONDS

1.1 : Définition

Les mélanges de type eutectique profond (MEP) sont généralement composés au minimum de deux espèces capables de s'associer entre elles par des liaisons intermoléculaires non-covalentes. Généralement, les liaisons hydrogène représentent les principales forces d'association entre les molécules. Ces interactions entraînent une diminution énergétique caractérisée par une réduction, parfois très conséquente, de la température de fusion du mélange. Généralement, les MEP résultent d'une très large diminution du point de fusion qui devient très inférieur à celui des constituants pris individuellement. Ainsi, le terme « eutectique » est utilisé pour définir le point de fusion le plus bas du mélange. Dans la plupart des cas, ces solvants peuvent être utilisés liquides à température ambiante ou à une température inférieure à 70°C. Comme initialement décrit et caractérisé au travers des nombreuses études de l'équipe du Prof. Andrew P. Abbott, un MEP est obtenu en mélangeant un sel d'ammonium avec des sels de métaux ou un donneur de liaison hydrogène. Historiquement, les MEP peuvent être définis selon la formule générale $R_1R_2R_3R_4N^+X^-.zY$ et classés en fonction du type de composé associé au sel d'ammonium:

Type 1 : Les sels de métaux. $Y=MCl_x$, $M=Zn, Sn, Fe, Al, Ga$

Type 2 : Les sels de métaux hydratés. $Y=MCl_x.yH_2O$, $M=Cr, Co, Cu, Ni, Fe$

Type 3 : Les donneurs de liaison hydrogène. $Y=R_5Z$, $Z=CONH_2, COOH, OH, NH_2$

De même, ces auteurs ont défini un MEP de type 4, composé d'un chlorure métallique (ex : $ZnCl_2$) associé à un donneur de liaison hydrogène du type urée, éthylène glycol, acétamide ou encore hexanediol.

Plus récemment, A. Kareem *et al.* (Kareem *et al.*, 2010) ont montré qu'il était possible de synthétiser des MEP en substituant le sel d'ammonium par un sel de phosphonium en le mélangeant à un donneur de liaison hydrogène de type glycérol, éthylène glycol ou encore 2,2,2-trifluoroacétamide. De cette façon, en se basant sur la théorie de formation de ces solvants, il devient aisé de synthétiser différents MEP. Le caractère biodégradable et respectueux de l'environnement attribué à ces solvants se fonde sur la relative innocuité des molécules qui les composent. Ainsi, afin de conserver cette classification, il convient d'apporter une attention toute particulière à la sélection des molécules initiales. Le tableau (Annexe 1) résume tous les mélanges eutectiques profonds synthétisés à ce jour, la nature des sels organiques en combinaison avec les donneurs de liaisons hydrogène et les températures de fusion.

Par ailleurs, le terme "natural deep eutectic solvent" (NADES), a été introduit très récemment par Choi *et al.* (Choi *et al.*, 2011; Dai *et al.*, 2013) pour décrire l'ensemble des mélanges eutectiques obtenus par combinaison de molécules présentes abondamment dans le monde vivant. D'après ces auteurs, ces mélanges interviendraient de façon prépondérante dans les processus cellulaires en participant entre autres à la biosynthèse de molécules insolubles dans l'eau. Ainsi, le concept de formation de NADES dans les milieux intra et extra cellulaire, permettraient d'expliquer comment les organismes vivants peuvent survivre à des conditions environnementales extrêmes telles que la sécheresse, le stress salin, le stress hydrique, le froid ou la chaleur. Des exemples de différents NADES ont été représentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 1). Une liste plus exhaustive avec les caractéristiques physico-chimiques de ces mélanges est donnée en annexe 2.

Composition NADES	Ratio molaire
Acide aconitique:ChCl	1:1
Acide malique:Glucose	1:1
Acide malique:Fructose	1:1
Acide malique:Sucrose	1:1
Acide citrique:Sucrose	1:1
Acide maléïque:Sucrose	1:1
Glucose:Fructose	1:1
Fructose:Sucrose	1:1
Glucose:Sucrose	1:1
Acide maléïque:Glucose	4:1
Acide citrique:Glucose	2:1

Tableau 1 : Composition et ratio molaire de quelques NADES (Choi *et al.*, 2011)

Il est important de signaler que tous ces mélanges eutectiques profonds peuvent être regroupés dans une grande famille de solvants appelé « Low-transition-temperature mixtures (LTTM) ». Littéralement, nous pouvons considérer ces solvants comme étant un mélange de molécules avec une température de transition (liquide-solide) basse. Le liquide peut être obtenu à la suite d'une fusion ou d'une transition vitreuse. Même si, lorsqu'il est question de MEP, il est fait souvent référence aux solvants de type 3 obtenus en mélangeant un sel organique et un donneur de liaison hydrogène, ce terme peut être également employé pour définir un milieu liquide caractérisé par une température de fusion et résultant du mélange d'au moins deux molécules. Quoi qu'il en soit, le terme LTTM sera utilisé pour généraliser l'ensemble des milieux liquides obtenu après association d'une molécule à dominante donneuse de liaison(s) hydrogène et d'une molécule à dominante accepteuse (Francisco *et al.*, 2013). *De facto*, l'immense diversité des molécules pouvant être combinée (10^6) ainsi qu'une possible biodégradabilité en font d'excellents candidats comme milieux réactionnels pour diverses applications. Des exemples de LTTM sont fournis en annexe 3.

1.2 : Synthèse des MEP.

Le pré requis avant de synthétiser un MEP est de connaître la composition à l'eutectique du mélange que l'on souhaite utiliser. Pour cela, la stratégie la plus couramment utilisée pour déterminer la composition d'un mélange eutectique est la calorimétrie différentielle à balayage (DSC). Cette technique mesure les variations d'échanges de chaleur entre un échantillon à analyser et une référence, ce qui permet de déterminer des transitions de phase. Dans notre cas, cette méthode renseigne sur la température de fusion d'un mélange de composition variable entre un donneur de liaisons hydrogène et un sel organique. Autrement dit, cette technique permet d'établir un diagramme de phase reliant la température de fusion du milieu à sa composition (Figure 1). Le point eutectique correspond alors au mélange pour lequel la température de fusion est minimale. Fait particulier, au point eutectique, le mélange se caractérise par une température de fusion unique et un comportement de corps pur (fusion à température constante).

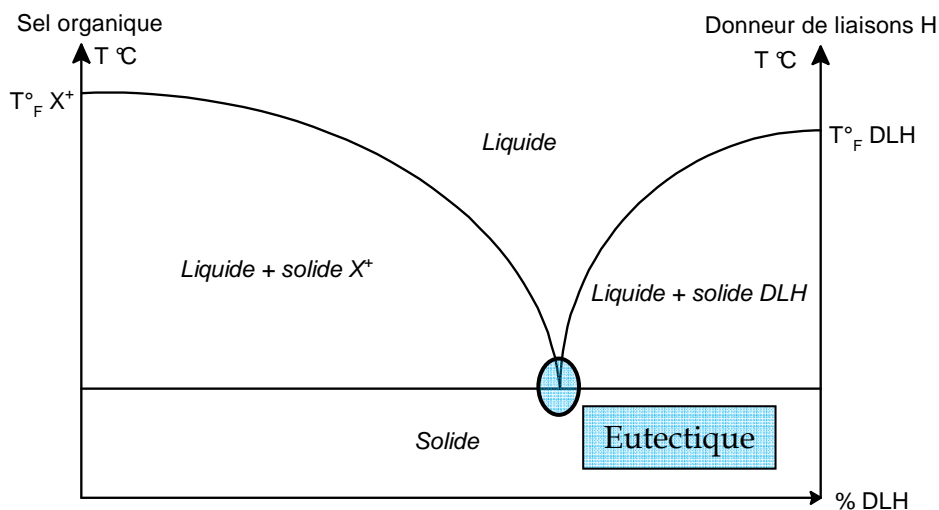


Figure 1 : Diagramme de phase caractéristique d'un MEP.

De façon plus rudimentaire, il est possible de déterminer le ratio molaire à l'eutectique par l'observation des températures de solidification de mélanges de composition variable et préalablement fondus. Cependant, cette méthode bien moins

précise que la précédente, n'est que très rarement utilisée (Abbott *et al.*, 2003; Abbott *et al.*, 2006a).

Enfin, bien qu'il soit possible d'utiliser un mélange de composition quelconque, la plupart des applications seront réalisées au point eutectique du mélange.

Contrairement aux liquides ioniques, dont la synthèse s'effectue en plusieurs étapes contraignantes (quaternisation du noyau imidazole et échange anionique), l'obtention des MEP ne requiert aucune étape préalable. Ils sont essentiellement préparés selon la procédure suivante avec une économie d'atome de 100%: (i) pesée directe des composants (DLH et sel) dans un flacon (en raison de leur forte hygroscopicité toutes les précautions doivent être prises pour isoler le mélange de l'humidité de l'air) puis (ii) chauffage et agitation jusqu'à ce qu'un liquide translucide soit formé (typiquement une heure à 100°C). Ainsi, une des préparations de solvant eutectique les plus représentatives est le mélange d'une mole de chlorure de cholinium avec deux moles d'urée (ayant des points de fusion respectif de 247°C et 133°C), mélange qui aboutit à un MEP de point de fusion très bas de l'ordre de 12°C (Abbott *et al.*, 2003). Au point eutectique, chaque ion chlorure fourni par le sel d'ammonium est complexé par deux molécules d'urée. Il est évident que le rapport molaire correspondant au point eutectique varie (en composition et en température) en fonction de la nature de chaque constituant. La rapidité et la facilité de mise en œuvre de ces solvants constituent donc un atout remarquable quant à leur développement et leur utilisation. En effet, l'un des problèmes récurrent associé à l'utilisation des liquides ioniques (hormis leur coût de production) est sans aucun doute leur préparation souvent complexe et fastidieuse qui accroît les risques potentiels d'impuretés dans le solvant. Il a été démontré que les propriétés physico-chimiques des liquides ioniques et la réactivité des systèmes catalytiques mis en jeu pouvaient être gravement affectées par les impuretés issues de la préparation du solvant, en particuliers les traces d'eau, d'halogénures et d'imidazole (Seddon *et al.*, 2000; Jastorff *et al.*, 2003; Ranke *et al.*, 2004; Canongia Lopes *et al.*, 2006; Triolo *et al.*, 2007; Ventura *et al.*, 2012).

Comme mentionné précédemment, de nombreuses associations de donneurs de liaison hydrogène et de sels organiques sont possibles et réalisables, dès lors que la température de fusion de l'eutectique obtenu est compatible avec l'application souhaitée. A cet égard, l'un des sels cationiques les plus couramment utilisés est le chlorure de cholinium qui présente les avantages d'être peu coûteux, biodégradable (plus de 93% de dégradation en 14 jours, selon l'OCDE-critères MITI-I d'essai; mesures de DBO) et non toxique. Par ailleurs, le chlorure de cholinium est facilement disponible et produit à l'échelle de millions de tonnes selon un procédé hautement économe en atomes et faiblement générateur de déchets. De plus, sa combinaison avec un donneur de liaisons hydrogène (glycérol ou urée) non toxique génère un mélange répondant parfaitement aux critères de durabilité et biocompatibilité.

1.3 : Propriétés physico-chimiques

1.3.1 : Point de fusion.

Les MEP sont caractérisés par des températures de fusion relativement basses. Comme mentionné précédemment, cette nouvelle phase liquide est obtenue en mélangeant deux composés, qui, par association *via* principalement des liaisons hydrogène conduit à un mélange dont la température de fusion est très inférieure à celles des composés pris séparément. Par exemple, l'association d'une mole de chlorure de cholinium (ChCl , $T^{\circ}\text{fusion}=247^{\circ}\text{C}$) à deux moles d'un donneur de liaison hydrogène tel que l'urée (U , $T^{\circ}\text{fusion}=133^{\circ}\text{C}$), résulte en un mélange dont le point de fusion (12°C) est inférieur respectivement de 235°C et 121°C . Abbott et al., à l'origine de cette découverte ont suggéré que cette diminution significative du point de fusion était due à l'interaction entre la molécule du donneur de liaison hydrogène et les espèces anioniques fournies par le sel. Selon ces auteurs, le donneur de liaison hydrogène agit comme agent complexant de l'espèce anionique ce qui a pour effet d'augmenter sa taille réelle, de diminuer ces interactions avec le cation et finalement d'abaisser le point de fusion du mélange. La force des liaisons hydrogène peut être corrélée avec la température de transition de phase observée et la stabilité du

mélange. En général, plus grande sera la capacité à donner et/ou à accepter des liaisons hydrogène des constituants, plus importante sera la diminution du point de fusion. De plus, la symétrie et le rayon du cation, mais aussi l'électronégativité de l'anion auront une influence sur cette transition de phase. Comme déjà mentionné, l'eutectique correspond au point de fusion unique et le plus bas du diagramme de phase du mélange. De ce fait, une variation dans le ratio molaire sel/DLH aura un impact significatif sur la température de fusion du solvant. Ainsi dans l'exemple précédent, lorsque ChCl est associé à l'urée à un ratio molaire de 1:1 ou de 1:2 (eutectique), la température du mélange résultant diminue considérablement en passant de plus de 50°C à 12°C (Abbott *et al.*, 2003). Même si aucune corrélation claire ne permet de déterminer le point de fusion d'un mélange en fonction de la nature des constituants utilisés, la transition de phase sera grandement fonction de:

- La structure du donneur de liaison hydrogène (volume, nature et nombre de liaison hydrogène potentiel).

Par exemple, dans les MEP formés à partir de ChCl et différents DLH, même si les ratios molaires à l'eutectique restent les mêmes, les températures de fusion peuvent varier de -66°C à 149°C (Abbott *et al.*, 2003; Abbott *et al.*, 2006b; Abbott *et al.*, 2007b; Maugeri e Dominguez, 2012; Shahbaz *et al.*, 2012) (Tableau 2).

Sel Cationique	Contre ion négatif	Donneur de Liaison Hydrogène	Ratio molaire à l'eutectique	Température de fusion (°C)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Urée	1:2	12
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Thiourée	1:2	69
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	1-Méthyl urée	1:2	29
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	1,3-Diméthylurée	1:2	70
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	1,1-Diméthylurée	1:2	149
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acetamide	1:2	51
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Benzamide	1:2	92
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Ethylène glycol	1:2	-66
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Glycérol	1:2	-40
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	2,2,2-Trifluoroacétamide	1:2	-45
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide levulinique	1:2	Ambiante
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide mandélique	1:2	33
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide valérique	1:2	22
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide glutamique	1:2	13
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	D-fructose	1:2	5
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Vanilline	1:2	17

Tableau 2 : Température de fusion et ratio molaire à l'eutectique de MEP à base de ChCl et différents DLH.

Un autre exemple concerne les MEP formés à partir d'un mélange équimolaire d'acides dicarboxyliques et de chlorure de cholinium et dont le point de fusion varie de 10 à 71 ° C (Abbott *et al.*, 2004) (Tableau 3).

Sel Cationique	Contre ion négatif	Donneur de Liaison Hydrogène	Ratio molaire à l'eutectique	Température de fusion (°C)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide oxalique	1:1	34
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide malonique	1:1	10
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide succinique	1:1	71
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide adipique	1:1	85

Tableau 3 : Température de fusion et ratio molaire à l'eutectique de MEP à base de ChCl et d'acides dicarboxyliques.

- La structure du sel cationique (Tableau 4).

L'association de l'urée à différents sels cationiques (ratio molaire de 1:2) ayant le même contre ion chlorure, résulte en des MEP de température de fusion fortement contrastée (-38°C à 26°C) (Abbott *et al.*, 2003).

Sel Cationique	Contre ion négatif	Donneur de Liaison Hydrogène	Ratio molaire à l'eutectique	Température de fusion (°C)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Urée	1:2	12
Benzyldiméthyl(2-hydroxyéthyl) ammonium	Cl ⁻	Urée	1:2	-33
Monoéthylcholinium	Cl ⁻	Urée	1:2	-38
Benzytriméthyl ammonium	Cl ⁻	Urée	1:2	26
Acétylcholinium	Cl ⁻	Urée	1:2	-14
(2-Chloroéthyl)triméthyl ammonium	Cl ⁻	Urée	1:2	15
Benzyldihydroxyéthyl(2-méthyl) ammonium	Cl ⁻	Urée	1:2	-6

Tableau 4 : Température de fusion et ratio molaire à l'eutectique de MEP à base d'urée et divers sels cationique ayant le même contre ion chlorure.

- La nature (électronégativité et polarisabilité) du contre ion anionique du sel (Tableau 5).

Par exemple, en changeant la nature de l'anion associé au sel de cholinium en mélange avec l'urée (ratio molaire sel:urée de 1:2) le point de fusion du MEP diminue suivant l'ordre F⁻ > NO₃⁻ > Cl⁻ > AcO⁻ > BF₄⁻, ce qui laisse supposer une corrélation entre la force des liaisons hydrogène et la température de fusion à l'eutectique (Abbott *et al.*, 2003).

Sel Cationique	Contre ion négatif	Donneur de Liaison Hydrogène	Ratio molaire à l'eutectique	Température de fusion (°C)
Cholinium (Ch)	F ⁻	Urée	1:2	1
Cholinium (Ch)	NO ₃ ⁻	Urée	1:2	4
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Urée	1:2	12
Cholinium (Ch)	AcO ⁻	Urée	1:2	18
Cholinium (Ch)	BF ₄ ⁻	Urée	1:2	67

Tableau 5 : Température de fusion et ratio molaire à l'eutectique de MEP à base de cholinium et d'urée et se différenciant par la nature du contre ion anionique.

A ce jour, tous les MEP synthétisés ont des températures de fusion inférieures à 150°C (Annexe 1). Cependant, les mélanges ayant un point de fusion inférieur à 60°C paraissent les plus attractifs, en particulier dans le domaine de la biocatalyse pour lequel l'activité enzymatique peut être affectée à des températures plus élevées.

1.3.2 : Viscosité, tension de surface, conductivité et densité.

La fluidité du mélange peut facilement être ajustée en fonction de la nature du sel cationique, du DLH (réseau tridimensionnel de liaisons hydrogène intermoléculaires), du volume et de la structure des composants, du rapport molaire, de la teneur en eau ou encore de la température. Toutefois, la viscosité (Tableau 6) et la tension de surface des MEP sont considérablement plus élevées que la plupart des solvants moléculaires classiques, mais comparables à celles des liquides ioniques (> 100cP et $\approx 50\text{mN.m}^{-1}$ à température ambiante) (Abbott *et al.*, 2003; Abbott *et al.*, 2006b; Kareem *et al.*, 2010; Abbott *et al.*, 2011; Shahbaz *et al.*, 2011; De Santi *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012; Maugeri e Dominguez, 2012).

Sel Cationique	Contre ion négatif	Donneur Liaison Hydrogène	Ratio molaire eutectique	Viscosité en cP
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Urée	1:2	750 (25°C)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Urée	1:2	169 (40°C)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Ethylène glycol	1:2	36 (20°C)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Glycérol	1:2	376 (20°C)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Glycérol	1:2	79 (50°C)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	2,2,2-Trifluoroacétamide	1:2	77 (40°C)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Imidazole	3:7	15 (70°C)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide oxalique	1:1	155 (45°C)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Glucose	1:1	34400 (50°C)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Glucose	1:1	4470 (70°C)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Xylitol	1:1	5230 (30°C)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	D-sorbitol	1:1	12730 (30°C)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Résorcinol	1:4	1883 (22°C)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	1,4butanediol	1:3	140 (20°C)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Glycine	1:1	121 (TA)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Alanine	1:1	163 (TA)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Sérine	1:1	402 (TA)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Thréonine	1:1	454 (TA)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Valine	1:1	372 (TA)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Leucine	1:1	476 (TA)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Isoleucine	1:1	480 (TA)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Méthionine	1:1	330 (TA)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Phénylalanine	1:1	520 (TA)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Tryptophane	1:1	5640 (TA)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Proline	1:1	500 (TA)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide aspartique	1:1	2060 (TA)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide glutamique	1:1	2308 (TA)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Asparagine	1:1	1903 (TA)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Glutamine	1:1	2589 (TA)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Lysine	1:1	460 (TA)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Histidine	1:1	980 (TA)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Arginine	1:1	1002 (TA)
Cholinium (Ch)	AcO ⁻	Urée	1:2	2214 (40°C)
Cholinium (Ch)	AcO ⁻	Glycérol	1:1.5	93 (50°C)
Ethyl ammonium (EA)	Cl ⁻	2,2,2-Trifluoroacétamide	1:1.5	256 (40°C)

Ethyl ammonium (EA)	Cl ⁻	Acétamide	1:1.5	64 (40°C)
Ethyl ammonium (EA)	Cl ⁻	Urée	1:1.5	128 (40°C)
Ethyl ammonium (EA)	Cl ⁻	Glycérol	1:4	400 (40°C)
Tetrapropyl ammonium	Br ⁻	Glycérol	1:4	730 (25°C)
Tetrabutyl ammonium	Br ⁻	Imidazole	3:7	810 (20°C)
Tetrabutyl ammonium	Br ⁻	Imidazole	3:7	27.8 (70°C)
Acetylcholinium	Cl ⁻	Glycérol	1:4	425 (25°C)
(2-Chloroethyl)trimethyl ammonium	Cl ⁻	Glycérol	1:4	428 (25°C)
Trimethylbenzyl ammonium	CH ₃ SO ₃ ⁻	Acide p-toluène sulfonique	1:1	1500 (30°C)
Méthyltriphényl phosphonium	Br ⁻	Glycérol	1:3	405 (55°C)
Méthyltriphényl phosphonium	Br ⁻	Ethylène glycol	1:4	5 (55°C)
Méthyltriphényl phosphonium	Br ⁻	2,2,2-trifluoroacétamide	1:8	7 (55°C)
Benzyltriphényl phosphonium	Cl ⁻	Glycérol	1:5	560 (55°C)
Benzyltriphényl phosphonium	Cl ⁻	Ethylène glycol	1:3	200 (55°C)

Tableau 6 : Composition et viscosité de différents MEP. TA=température ambiante.

La fluidité d'un mélange considéré est régit par l'important réseau de liaisons hydrogène établi entre chaque constituant, mais aussi par les interactions de type Van der Waals ou électrostatiques. Cependant, la nature du donneur de liaison hydrogène est sans doute le paramètre le plus influent sur la viscosité du milieu. En effet, les MEP dérivés de diacides carboxyliques ou de sucres présentent des viscosités nettement plus élevées que tous les autres MEP, ce qui pourrait en partie s'expliquer par un réseau tridimensionnel de liaisons hydrogène intermoléculaire beaucoup plus robuste. Dans le cas des diacides carboxyliques, une viscosité plus importante peut être expliquée aussi par une dimérisation des molécules (D'agostino *et al.*, 2011). Par ailleurs, la viscosité d'un MEP peut être également fonction du volume libre disponible au sein même de la matrice, c'est pourquoi la « théorie du trou » peut être utilisée pour expliquer leur comportement (Abbott *et al.*, 2006a; Abbott *et al.*, 2007c). Ainsi, la viscosité est liée au volume libre et à la probabilité d'existence de « trous » susceptibles, de par leur dimension, d'accueillir des molécules ou des ions. Le volume libre et la conductivité peuvent être augmentés par l'abaissement de la tension superficielle en utilisant des ions de faible volume. Par

conséquent, l'utilisation de petits cations d'ammonium quaternaire ou des donneurs de liaisons hydrogène de type fluoré permettront d'obtenir des MEP avec de faibles viscosités (Abbott *et al.*, 2006d). De plus, la viscosité des MEP diminue de façon significative lorsque la température augmente et est inversement proportionnelle à la conductivité (Abbott *et al.*, 2004). En effet, la conductivité, initialement faible dans de tels milieux ($<2\text{mS.cm}^{-1}$) augmente de façon significative avec l'élévation de la température ce qui témoigne de la dissociation et d'un déplacement indépendant des espèces ioniques dans le liquide (Abbott *et al.*, 2003). Si le niveau de viscosité minimal est atteint à l'eutectique pour la plupart des MEP, il peut l'être également dans son proche voisinage pour d'autres (Abbott *et al.*, 2007c; Zhao *et al.*, 2011). Fait important, l'addition d'un sel cationique (ChCl) à un DLH du type éthylène glycol ou 1,4 butanediol, a pour effet une augmentation de la viscosité (Abbott *et al.*, 2007c). En revanche, dans les MEP dérivés du glycérol, le phénomène inverse se produit avec une diminution de la viscosité par ajout de ChCl (Abbott *et al.*, 2011). Cette observation confirme l'influence de l'organisation du réseau de liaisons hydrogène sur la fluidité du milieu. En effet, les diols ont tendance à former des interactions linéaires contrairement au glycérol qui forme quant à lui des liaisons tridimensionnelles avec plus d'ordre, plus de densité et avec plus de surface de tension. De ce fait, l'addition de sel dans un tel système désorganise ce réseau par la complexation du chlorure avec les groupements hydroxyles, ce qui entraîne une diminution de la surface de tension et l'ouverture de volume libre dans le mélange permettant ainsi une plus grande mobilité des espèces chargées.

Même si la densité peut varier en fonction de la composition molaire du mélange, les MEP présentent une densité généralement plus élevée que l'eau. La densité dans de tels mélanges s'explique aussi par la « théorie du trou » et la présence de volume libre au sein de la matrice. Par exemple, un MEP ayant une densité plus faible que celui du DLH pur s'expliquera par une augmentation du volume libre, ce qui est le cas du mélange eutectique ChCl:Gly. A l'inverse, un MEP avec une densité plus grande que celle du DLH pur sera dû à une diminution des espaces vacants (ZnCl_2 -Urée). Le Tableau 7 ci-dessous donne les valeurs de la conductivité et de la densité de certains MEP.

Sel Cationique	Contre ion négatif	Donneur Liaison Hydrogène	Ratio molaire	Conductivité (mS.cm ⁻¹)	Densité g.cm ⁻³
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Urée	1:2	0.199 (40°C)	1.24 (40°C)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Ethylène glycol	1:2	1.13 (TA)	1.13 (TA)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Glycérol	1:2	1.19 (TA)	1.19 (TA)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	2,2,2-Trifluoroacétamide	1:2	1.342 (40°C)	1.342 (40°C)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Glucose	1:1	1.24 (25°C)	1.24 (25°C)
Cholinium (Ch)	AcO ⁻	Urée	1:2	1.206 (40°C)	1.206 (40°C)
Ethyl ammonium (EA)	Cl ⁻	2,2,2-Trifluoroacétamide	1:1,5	1.273 (40°C)	1.273 (40°C)
Ethyl ammonium (EA)	Cl ⁻	Acétamide	1:1,5	1.041 (40°C)	1.041 (40°C)
Ethyl ammonium (EA)	Cl ⁻	Urée	1:1,5	1.14 (40°C)	1.14 (40°C)
N,N-diéthyléthanol ammonium	Cl ⁻	Glycérol	1:4	1.22 (25°C)	1.22 (25°C)
N,N-diéthyléthanol ammonium	Cl ⁻	Ethylène glycol	1:3	1.12 (25°C)	1.12 (25°C)
N,N-diéthyléthanol ammonium	Cl ⁻	2,2,2-trifluoroacétamide	1:2	1.346 (25°C)	1.346 (25°C)
Méthyltriphenyl phosphonium	Br ⁻	Glycérol	1:3	1.30 (25°C)	1.30 (25°C)
Méthyltriphenyl phosphonium	Br ⁻	Ethylène glycol	1:4	1.25 (25°C)	1.25 (25°C)
Méthyltriphenyl phosphonium	Br ⁻	Triéthylène glycol	1:5.25	1.19 (25°C)	1.19 (25°C)
Méthyltriphenyl phosphonium	Br ⁻	2,2,2-trifluoroacétamide	1:8	1.39 (25°C)	1.39 (25°C)

Tableau 7 : Conductivité et densité de plusieurs MEP. TA=température ambiante.

1.3.3 : Acidité et alcalinité.

Concernant la valeur de pH, sa mesure dans de tels systèmes est rendue très complexe du fait de la très faible activité chimique des ions hydrogène. En effet, dans des milieux non aqueux ou très faiblement hydratés (<5% en masse) il devient très difficile de mesurer l'état de dissociation de l'eau par une méthode traditionnelle à l'aide d'un pH mètre. Néanmoins, différentes méthodes et en particulier celle développée par Hammett en 1932, basée sur une détermination

spectrophotométrique de l'état d'ionisation d'un indicateur dans un milieu, permet d'apporter des indications fiables sur l'acidité ou la basicité d'un système non aqueux. Ainsi, des résultats de mesure de pH dans des MEP ont révélé que la nature chimique du donneur de liaison hydrogène conditionnait l'état d'acidité ou de basicité du milieu correspondant, avec une très légère influence de la température. Certains MEP possèdent des pH basiques, comme dans le cas de ChCl:U avec une valeur de 10.86 (Li *et al.*, 2008), ou neutres comme observé dans Me(Ph)₃PBr:Gly (Kareem *et al.*, 2010) et dans la plupart des MEP du type ChCl:sucre (Maugeri e Dominguez, 2012), ou bien encore acides (pH Me(Ph)₃PBr:CF₃CONH₂ \approx 3) (Kareem *et al.*, 2010). De plus, une très faible quantité d'eau (1-3%) dans un MEP de type ChCl:U n'a que très peu d'incidence sur les valeurs du pH (10.77-10.65). En revanche, dans ce même solvant, la dissolution d'une faible quantité de CO₂ peut faire diminuer le pH de 10.86 à 6.25, mais celui-ci peut être rétabli après bullage d'azote suggérant une possible réversibilité acido-basique d'un tel mélange (Li *et al.*, 2008).

1.3.4 : Stabilité thermique et polarité.

Des analyses thermogravimétriques de MEP ont révélé une très grande stabilité thermique de ces solvants avec des températures de décomposition élevées, notamment supérieures à 200°C (Zhao *et al.*, 2011). La polarité de ces solvants a pu être mesurée par une relation de calcul des énergies libres de transferts déterminée empiriquement par Reichardt. Cette méthode repose sur l'évolution des *maxima* d'absorption d'un colorant de référence qui reflète l'effet du solvant sur la différence d'énergie entre les molécules à l'état fondamental et à l'état excité. Les valeurs de polarité des MEP données dans le Tableau 8, ont été obtenues en utilisant le concept appelé Reichardt's Dye 30 ou E^T(30). La très forte polarité des MEP, en comparaison aux solvants moléculaires, peut une nouvelle fois s'expliquer par l'important réseau de liaisons hydrogène responsable de la formation de ces mélanges (Gorke *et al.*, 2008).

Sel Cationique	Contre ion négatif	Donneur Liaison Hydrogène	Ratio molaire	Polarité
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acétamide	1:2	0.77
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Ethylène glycol	1:2	0.8
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Glycérol	1:2	0.84
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Urée	1:2	0.84
Ethyl ammonium (EA)	Cl ⁻	Acétamide	1:1.5	0.85
Ethyl ammonium (EA)	Cl ⁻	Ethylène glycol	1:1.5	0.88
Ethyl ammonium (EA)	Cl ⁻	Glycérol	1:4	0.93
Eau	-	-	-	1
Triméthylsilane	-	-	-	0
Méthanol	-	-	-	0.76

Tableau 8 : Polarité de plusieurs MEP obtenue en utilisant le concept Reichardt's Dye 30.

1.3.5 : Toxicité, biodégradabilité et dangerosité.

La toxicité et la biodégradabilité de ce type de solvant vont dépendre quasi exclusivement des éléments qui le composent (sel cationique, contre ion et donneur de liaison hydrogène). Ainsi, le chlorure de cholinium (ChCl) dont la biodégradabilité (plus de 93% de dégradation en 14 jours) et la non toxicité (additif alimentaire) sont avérées, en mélange avec un donneur de liaisons hydrogène de très faible toxicité (glycérol, urée, etc...) donnera un MEP totalement durable et biocompatible. Ceci a été confirmé par des études de toxicité sur des bactéries (gram + et -) qui n'ont révélé aucun effet toxique de ces mélanges (Hayyan *et al.*, 2013b). Dans cette même étude, les auteurs ont cependant démontré qu'il existait une plus forte cytotoxicité du mélange eutectique comparée à l'effet des constituants pris individuellement. Une étude quasi similaire a été effectuée sur des MEP à base de sel de phosphonium (Bromure de méthyle triphényl Phosphonium) avec le même type de DLH (Hayyan *et al.*, 2013a). Concernant la cytotoxicité de ces mélanges, les conclusions établies dans la première étude ont été confirmées, à savoir, une plus forte cytotoxicité du mélange eutectique en comparaison à l'effet des constituants pris individuellement. Toutefois, ces résultats sont à relativiser en raison de la viscosité de ces solvants et son effet négatif probable sur le transfert de masse et le

manque d'oxygénation du milieu. Par ailleurs, à l'inverse des résultats trouvés pour les MEP formés à partir de CHCl_3 , ces MEP se sont révélés être néfastes pour la croissance de bactéries (gram + et -). Ce dernier résultat permet de mettre en évidence l'influence des molécules (ici le sel) sur les propriétés de biodégradabilité et de toxicité des MEP.

Enfin, leur très faible pression de vapeur saturante associée à une très forte stabilité thermique ($>200^\circ\text{C}$) et une ininflammabilité en font des solvants pouvant être manipulés, même en conditions extrêmes de température et de pression, sans dangerosité particulière.

1.4 : Propriétés de solvation

1.4.1 : Miscibilité des mélanges eutectiques profonds avec les solvants organiques

Les MEP présentent des propriétés de solvation inhabituelles qui sont fortement influencées par les liaisons hydrogène intermoléculaires, entraînant une très grande affinité pour tous les composés susceptibles de donner des électrons ou des protons. De ce fait, les solvants capables d'établir des liaisons hydrogène auront tendance à être miscibles avec les MEP ce qui est le cas avec le méthanol ou l'éthanol. Ces substances pourront donc être utilisées comme solvants d'analyse pour homogénéiser le milieu réactionnel en fin d'application. En revanche, les solvants apolaires tels que l'hexane ou le toluène, qui sont incapables de créer ce type de liaison, seront complètement immiscibles avec les MEP. Il en est de même pour les solvants polaires conventionnels du type acétone, acétonitrile, ou encore THF qui bien qu'étant hydrophiles et accepteurs de liaison hydrogène n'auront qu'une très faible miscibilité avec ces milieux. Ces solvants pourront alors être utilisés pour effectuer des systèmes biphasiques ou pour l'extraction de molécules.

1.4.2 : Miscibilité des mélanges eutectiques profonds avec l'eau

Ces propriétés de solvation et cette affinité toute particulière pour les substances polaires protiques rendent la quasi-totalité des MEP très hygroscopiques. C'est pourquoi des précautions doivent être prises pour minimiser l'absorption d'eau par ces solvants. Par exemple, un MEP formé à partir de chlorure de cholinium et d'acide lévulinique est capable d'absorber en une heure plus de 8% en masse d'eau provenant de l'humidité ambiante (Maugeri e Dominguez, 2012). Néanmoins, cette caractéristique peut faire de ces solvants un matériel peu coûteux et biodégradable comme absorbeur d'humidité. L'affinité de ce type de solvant avec l'eau a été mise en avant dans de nombreuses expériences basées sur les propriétés physiques et thermodynamiques de cette association (Leron e Li, 2012; Leron *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012). Ces études ont révélé une augmentation des interactions au sein du mélange binaire (MEP-eau) en comparaison à celles obtenues dans le mélange eutectique pur, ce qui confirme l'augmentation du nombre de liaisons hydrogène. En effet, des valeurs négatives dans l'excès des capacités calorifiques molaires C_p^E ainsi que du volume molaire V_M^E dans ce mélange binaire, mettent en évidence une contraction du volume global pouvant être attribuée aux fortes liaisons hydrogène qui interviennent entre le MEP et l'eau. Par ailleurs, selon les résultats de C. Gutiérrez et al. (Gutierrez *et al.*, 2009), il faut ajouter un grand excès d'eau dans un MEP pour perdre le complexe supramoléculaire entre le contre ion négatif du sel et le donneur de liaison hydrogène caractéristique de ces milieux, et pour obtenir un système équivalent à une simple dilution des composants dans l'eau. A partir de ces expériences, la teneur massique en eau maximale "autorisée" dans un mélange eutectique ChCl:U est proche de 50% pour ne pas provoquer la rupture entre l'urée et l'halogénure. Notons que les MEP synthétisés à partir de donneurs de liaisons hydrogène fluorées auront des propriétés de solvation de l'eau complètement différentes (Abbott *et al.*, 2006d). En effet, un mélange eutectique obtenu par association du chlorure de cholinium au trifluoroacétamide (ChCl:CF₃CONH₂) dans un ratio molaire de 1 pour 2, sera complètement immiscible avec l'eau.

2. UTILISATION DES MELANGES EUTECTIQUES PROFONDS COMME SOLVANTS

2.1 : Dans les procédés électrochimiques

L'électrochimie regroupe de nombreux domaines d'applications qui étudient la relation entre transformations chimiques et passage de courant électrique. Parmi eux, l'électrodéposition est un procédé permettant la formation de matériaux solides par des réactions électrochimiques dans une phase liquide (électrolyte). De façon très succincte, le métal sous sa forme cationique contenu dans un électrolyte est réduit à la cathode et déposé sous forme de métal. L'électrolyte doit être inerte et résistant contre les réductions ou oxydations électrochimiques. En d'autres termes, l'électrolyte doit pouvoir bénéficier d'une fenêtre électrochimique la plus grande possible, c'est à dire avoir une gamme de potentiels sur laquelle il est ni oxydé ni réduit à la surface de l'électrode. Bien que les fenêtres possibles pour les MEP soient sensiblement plus petites que celles de certains liquides ioniques de sel d'imidazolium, elles sont suffisamment larges pour permettre le dépôt de métaux avec des rendements élevés. De plus, la très forte résistance thermique et chimique des MEP, leur faible coût d'utilisation, leur biodégradabilité mais aussi leur tolérance à l'eau sont autant d'atouts supplémentaires pour ce type d'application. Leurs utilisations comme électrolyte est même l'une des toutes premières applications et regroupent à ce jour le plus grand nombre de publications. Ainsi, un certain nombre de travaux ont pu démontrer l'applicabilité de cette classe de solvants comme milieux d'électrodéposition pour une gamme de métaux de transition et d'alliages, Cu et Ni (Abbott *et al.*, 2008; Abbott *et al.*, 2009), Ag (Abbott *et al.*, 2007d), Zn et Zn-Sn (Abbott *et al.*, 2007a). En outre, le mélange eutectique ChCl:éthylène glycol (ratio 1:2) a également été utilisé avec succès pour l'électropolissage (technique chimique de traitement de surface par action électrolytique) de l'acier inoxydable (Abbott *et al.*, 2006a). A noter que les sociétés Scionix et Ionmet développent des techniques

d'électropolissage à l'échelle industrielle de divers éléments métalliques en utilisant des MEP comme électrolyte.

2.2 : Pour la préparation de matériaux inorganiques

Typiquement, la préparation de matériaux inorganiques tels que les métaux, les semi-conducteurs, les céramiques ou bien encore les polymères, sera effectuée dans l'eau ou dans les solvants organiques. Ce procédé communément appelé « synthèse solvothermale » implique l'utilisation du solvant sous pression (typiquement entre 1 atm et 10 000 atm) à de très hautes températures (typiquement entre 100 ° C et 1000 ° C) nécessaires à l'interaction des précurseurs pendant la synthèse. Si l'eau est utilisée comme solvant, la méthode est appelée "synthèse hydrothermale". Ce processus peut être employé pour préparer de nombreux matériaux à géométrie variable telle que des films minces, des poudres, des cristaux simples, ou des nanocristaux. De plus, la morphologie des cristaux formés (sphère (3D), tige (2D), ou fil (1D)) peut être fonction des conditions opératoires : sursaturation du solvant, concentration des réactifs ou encore contrôle de la cinétique. La méthode peut être utilisée pour préparer de nouveaux matériaux difficilement accessibles par d'autres voies de synthèse. En 2004, encouragé par la découverte et l'émergence de ces nouvelles stratégies de synthèse, le Dr Morris mis au point une nouvelle méthode : « la synthèse ionothermale », impliquant l'utilisation des liquides ioniques ou des MEP comme solvant. Grâce au double rôle de solvant et d'agent structurant, ces milieux peuvent permettre la formation de matériaux avec une morphologie contrôlée tout en réduisant considérablement les risques et en simplifiant la méthode. En synthèse solvothermale, la faible vapeur de pression saturante du solvant n'est pas compatible avec l'utilisation de hautes températures indispensables à la cristallisation et au contrôle architectural du matériau. C'est pourquoi ces synthèses requièrent fréquemment l'utilisation d'autoclaves à très haute pression. La très faible volatilité et la stabilité thermique de ces nouveaux milieux (LI et MEP) offrent la possibilité de réaliser ces synthèses à haute température avec de très faibles pressions. De plus, dans le cas des MEP, la

multitude de combinaisons possibles entre les constituants permet d'obtenir des solvants avec des caractéristiques d'orientation tridimensionnelle différentes. Aussi, ces avantages ont-ils largement contribué au succès de ces solvants dans les domaines de la synthèse ionothermale de matériaux et le « design » de nouvelles structures telles que aluminophosphates (Cooper *et al.*, 2004), zincophosphates (Liao *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009b), zirconium phosphates (Liu *et al.*, 2009a), borophosphates (Lin *et al.*, 2009) ou encore métallophosphates (Jhang *et al.*, 2009).

2.3 : Dans les procédés de séparation, de solubilisation et d'extraction

Nous avons déjà souligné les propriétés de solvation inhabituelles des MEP, qui sont fortement influencées par les liaisons hydrogène, entraînant une très grande affinité pour tous les composés susceptibles de donner des électrons ou des protons. Ainsi, ces solvants peuvent être utilisés pour de nombreuses applications, telles que la dissolution, la solubilisation ou l'extraction de molécules.

2.3.1 : Dissolution de gaz (CO₂ et SO₂)

La dissolution de gaz dans des MEP pourrait permettre à ces solvants d'être mis en application dans de nombreux procédés tels que la séparation, la purification, la catalyse et la fixation de gaz. Des études préliminaires de solubilisation de gaz tels que le CO₂ ou le SO₂ dans ce type de solvant ont été réalisées, avec des résultats particulièrement prometteurs. Ainsi, (Li *et al.*, 2008) ont déterminé la solubilité du CO₂ dans un mélange ChCl:U à différentes températures et pressions en faisant varier le ratio molaire pour le MEP. Les résultats ont montré que la solubilité du CO₂ dans ce solvant augmentait avec la pression mais diminuait avec l'accroissement de la température. De plus, le ratio molaire avait une importance considérable sur la solubilisation du gaz, ainsi, un ratio 1:2 (correspondant à l'eutectique) permettait une plus grande efficacité de solubilisation que ceux à 1:1.5 ou 1:2.5. Plus récemment, (Su *et al.*, 2009) ont étudié la solubilité du CO₂ dans ce même solvant en mélange binaire avec l'eau à différentes températures et à pression constante. Les résultats ont révélé une diminution de la solubilité du gaz dans ChCl:U (ratio 1:2) lorsque la teneur en

eau dans le solvant augmentait. Encore plus intéressant dans cette même étude, le calcul de l'enthalpie d'adsorption du CO₂ a révélé que le phénomène d'adsorption était endothermique lorsque le ratio MEP/eau était supérieur à 0.231 et exothermique lorsqu'il était plus faible. En 2013, (Liu *et al.*, 2013) ont réalisé des mesures d'absorption du SO₂ dans cinq MEP formés à partir de caprolactame en mélange avec différents donneurs de liaison hydrogène (acétamide, imidazole, acide furoïque, acide benzoïque et acide toluïque). Les résultats ont révélé un effet négatif de l'augmentation de la température sur la solubilité du gaz dans les MEP, confirmant le résultat des travaux précédents. De plus, les MEP formés à partir des donneurs de liaison hydrogène du type amino ont révélé une plus grande efficacité d'absorption du SO₂, comparée aux MEP dérivés des acides organiques. Les meilleurs résultats de solubilité du SO₂ ont été observés dans le MEP caprolactame:acétamide, avec des capacités d'absorption plus élevées que dans le liquide ionique BMimBF₄, mais plus faibles que dans le DMSO.

2.3.2 : Solubilisation de principe actif, oxyde de métal et autres molécules.

De nombreuses études ayant pour but de déterminer la solubilisation de diverses molécules dans les MEP ont été entreprises. Ainsi, Abbott *et al.* (Abbott *et al.*, 2003) ont constaté qu'il était possible de solubiliser dans ChCl:U une large gamme de composés tel que les sels inorganiques (ex : LiCl > 2.5 mol.L⁻¹ ou AgCl = 0.66 mol.L⁻¹), des composés aromatiques (acide benzoïque = 0.82 mol.L⁻¹) ou encore des acides aminés (D-alanine = 0.38 mol.L⁻¹). Encore plus intéressant, la capacité des MEP à dissoudre divers oxydes métalliques, permettant de mettre au point des stratégies « vertes » pour la séparation et le recyclage des métaux, un point clé dans le développement des technologies électrochimiques précédemment citées. Ainsi, en 2003 Abbott fut le premier à tester la potentiel d'un MEP (ChCl:U) pour la dissolution d'oxyde de cuivre (Abbott *et al.*, 2003). Peu après, ce même auteur a étudié la solubilité de trois oxydes métalliques (ZnO, CuO et Fe₃O₄) dans divers MEP synthétisés à partir de ChCl en association avec différents acides carboxyliques

(Abbott *et al.*, 2006a). Les résultats ont montré des disparités notables dans la solubilité de ces métaux selon la nature du donneur de liaison hydrogène, soulignant une nouvelle fois les différences significatives d'un solvant à un autre en fonction de la nature d'une de ses composantes. Par ailleurs, ZnO et CuO sont solubles dans de tels solvants alors que Al₂O₃ ne l'est pas. Cette dissimilitude de comportement selon la nature du MEP peut néanmoins être habilement utilisée pour la récupération sélective de métaux dans les traitements électrochimiques. D'autres études se sont succédées pour quantifier la dissolution des oxydes de métaux dans des MEP (Abbott *et al.*, 2006c) et des calculs de chimie quantique ont même été réalisés dans le but de déterminer l'énergie de liaison intervenant lors de l'association d'éléments métalliques avec les constituants du MEP (Rimsza e Corrales, 2012).

Par ailleurs, bien que les études menées à ce jour aient été extrêmement rares, la dissolution de molécules organiques dans les MEP a aussi été testée. Ainsi, Morisson *et al.* (Morrison *et al.*, 2009), ont étudié la solubilisation de plusieurs principes actifs (griséofulvine, danazol, AMG517 et itraconazole) dans deux MEP (ChCl:urée et ChCl:acide malonique) purs ou en mélange binaire avec de l'eau. Les résultats ont montré que la solubilité de ces principes actifs dans les MEP était 5 à 22000 fois plus importante que dans l'eau pure. Par exemple, la solubilité du danazol dans l'eau est <0.0005mg.ml⁻¹ alors qu'elle est respectivement de 0.048mg.ml⁻¹ et 0.160mg.ml⁻¹ dans ChCl:urée et ChCl:acide malonique. En revanche, il est important de constater que l'utilisation de solution aqueuse individuelle d'urée, d'acide malonique ou de ChCl n'amène pas d'augmentation systématique et significative de la solubilisation des principes actifs, ce qui souligne le comportement particulier des mélanges eutectiques.

Dans un autre registre, des travaux récents sur la stabilité et la structure quaternaire des acides nucléiques dans les MEP ont montré que l'ADN pouvait former différentes structures secondaires ultra stables (Mamajanov *et al.*, 2010), y compris à des températures élevées de l'ordre de 110°C (Zhao *et al.*, 2013). Ainsi, les MEP semblent donc constituer un environnement particulièrement adapté à la formation de structures intramoléculaires et/ou intermoléculaires ordonnées et stables de

macromolécules, ce qui ouvre de nouvelles perspectives quant à l'utilisation de ces solvants dans les domaines de la biologie et de la médecine.

2.3.3 : Solvants dans les procédés d'extraction ou de séparation

- Extraction du glycérol issu de la préparation du biodiesel :

Une autre application intéressante de ces mélanges est la purification du biodiesel brut par extraction du glycérol, un co-produit de la réaction de transestérification d'huiles végétales avec le méthanol ou l'éthanol. Ce principal sous-produit de l'industrie du biodiesel peut être séparé de la fraction lipidique, et/ou récupéré, en utilisant plusieurs méthodes : le lavage (Berrios e Skelton, 2008), l'adsorption sur gel de silice (Yori *et al.*, 2006) ou encore l'addition de chaux ou d'acide phosphorique (Chiu *et al.*, 2005). Cependant, ces techniques ne peuvent pas être utilisées à l'échelle industrielle en raison de leur coût et de la complexité de leur mise en œuvre. Dans ce contexte, l'équipe d'Abbott a eu l'idée de développer une nouvelle stratégie qui consiste à extraire le glycérol du biodiesel brut sous la forme d'un MEP. Ce dernier est formé par l'ajout d'un sel qui, combiné au glycérol dans des proportions adéquates, constitue une phase non miscible aisément séparable du biodiesel. (principe général Figure 2)

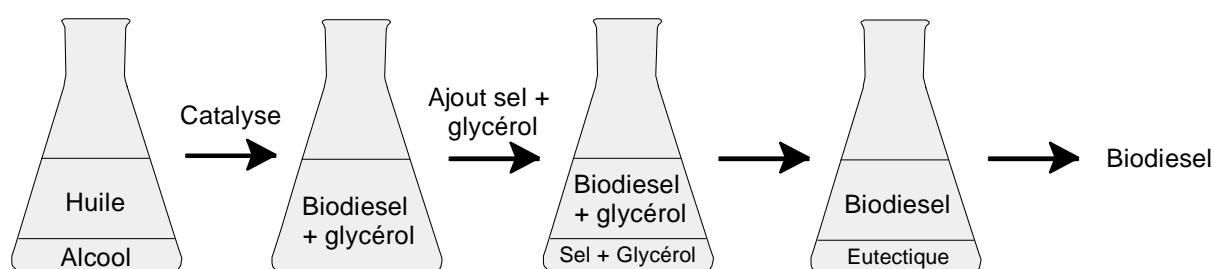


Figure 2 : Extraction du glycérol issu de la préparation du biodiesel par formation d'un MEP

La première étude qui a été réalisée consistait en l'addition de sels d'ammonium purs directement au biodiesel brut, afin de créer spontanément un MEP avec le glycérol libéré au cours du processus de transestérification (Abbott *et al.*, 2007b). Malheureusement, cette approche n'a pas abouti. La deuxième a eu pour but

d'ajouter un MEP dans le biodiesel brut avec un ratio molaire en donneur de liaison hydrogène inférieur à celui de l'eutectique. Cette seconde stratégie s'est avérée être nettement plus efficace pour extraire le glycérol (Abbott *et al.*, 2007b; Hayyan *et al.*, 2010). Dans ces études, l'idée a été d'ajuster le ratio molaire du MEP ainsi que le ratio MEP/biodiesel dans le but d'obtenir, après extraction du glycérol total créé pendant la réaction, la composition du ratio molaire à l'eutectique. Par exemple, en 10 min il a été possible d'extraire 99% du glycérol provenant de la formation du biodiesel. Actuellement, de plus en plus de travaux sont réalisés dans le but d'optimiser les conditions d'extraction du glycérol en faisant varier la nature des sels cationiques (ammonium ou phosphonium), la nature du donneur de liaison hydrogène ou bien encore le ratio molaire avec la mise au point de système en continu ... (Shahbaz *et al.*, 2011).

- Extraction de molécules :

A ce jour, l'étendue des recherches traitant de l'efficacité des mélanges eutectiques comme solvants dans des procédés d'extraction ou de séparation de molécules reste relativement faible. En particulier, il serait très intéressant d'utiliser l'adaptabilité de ces solvants, leur thermo résistance et leur faible pression de vapeur saturante pour l'extraction liquide-solide ou liquide-liquide de molécules d'intérêt. Par exemple, (Bi *et al.*, 2013) ont évalué l'efficacité des MEP pour extraire des polyphénols de la feuille du *Chamaecyparis obtusa* (CO). Ils ont testé différents ratios molaires de MEP synthétisés à partir de chlorure de cholinium (ChCl) et sept donneurs de liaison hydrogène présentant une fonction alcool. Les paramètres (température, addition d'eau, ratio solide/liquide) ont été optimisés par la méthode des surfaces de réponses (MSR) et les résultats ont été comparés à différentes méthodes d'extraction (ultrasons, température et agitation mécanique). Les meilleures conditions d'extraction ont été obtenues à 70°C en présence de 30% d'eau dans ChCl:1,4butanediol avec un ratio 1:5. Ces résultats ont été comparés (quantité de polyphénols extraits et coût du procédé) à d'autres méthodes d'extractions utilisant les solvants organiques. En plus des résultats intrinsèques sur l'amélioration de

l'extraction de ces polyphénols, ce procédé permet une réduction significative du coût des procédés.

Dans le même ordre d'idée, on peut citer la séparation de phénol à partir d'huile végétale *via* l'addition de sels d'ammonium (TMAC, TMAB, TEAC, MTAC, TEAB, TBAC, TPAC, NH_4Cl , ChBr ChCl (Pang *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2013). En contraste avec les méthodes traditionnelles d'extraction des composés phénoliques des huiles alimentaires, cette méthode implique la formation de mélanges eutectiques avec des sels d'ammonium et évite l'utilisation de bases et d'acides. Les résultats ont montré que les sels d'ammonium quaternaire, composés de cations symétriques avec des longueurs de chaînes appropriées et d'un anion à forte électronégativité, étaient les plus efficaces. Ainsi, le maximum d'extraction (99.9%) a été atteint avec TEAC, pour un ratio TEAC:phénol de 0,8:1. Par ailleurs, l'équilibre d'extraction étant très rapide, l'efficacité n'est pas sensible à la température.

2.4 : Solvants et/ou catalyseurs en synthèse organique

Les mélanges eutectiques peuvent aussi être utilisés avec succès comme milieu réactionnel et/ou catalyseur pour la synthèse de molécules organiques. Par exemple, le ChCl:U a été remarquablement utilisé dans des réactions de substitution électrophile pour la synthèse de dérivé du 1-aminoanthra-9-10-quinone, avec des rendements de 84% à 95% à 80°C (Phadtare e Sharkarling, 2010). Par comparaison avec les solvants organiques traditionnellement utilisés pour cette synthèse (MeOH ou CHCl_3), la réaction a été grandement améliorée. A noter la possibilité de séparer sélectivement le produit par précipitation après addition d'eau, permettant une réutilisation du mélange jusqu'à cinq fois sans réduction apparente des rendements. De nombreux auteurs ont utilisé les MEP comme solvants pour des synthèses impliquant des réactions de substitution nucléophile (Sonawane *et al.*, 2010; Barrett *et al.*, 2011; Pawar *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2011; Azizi *et al.*, 2012a; Azizi *et al.*, 2012b). Citons par exemple les travaux de Singh *et al.* (2011) concernant la N-alkylation de l'aniline avec le bromure d'hexyle dans ChCl:U à 50°C (78% de rendement en 4h), ou

bien encore, la synthèse de différents chromophores par condensation de Knoevenagel dans ChCl:U réalisée par Sonawane *et al.* (2010), avec des rendements de 75-95% (Figure 3). Notons aussi la possibilité de synthétiser avec des rendements de 62-92% une série de molécules dérivées de l'acide cinnamique, *via* la réaction de Perkin dans ChCl:U à 30°C (Pawar *et al.*, 2011).

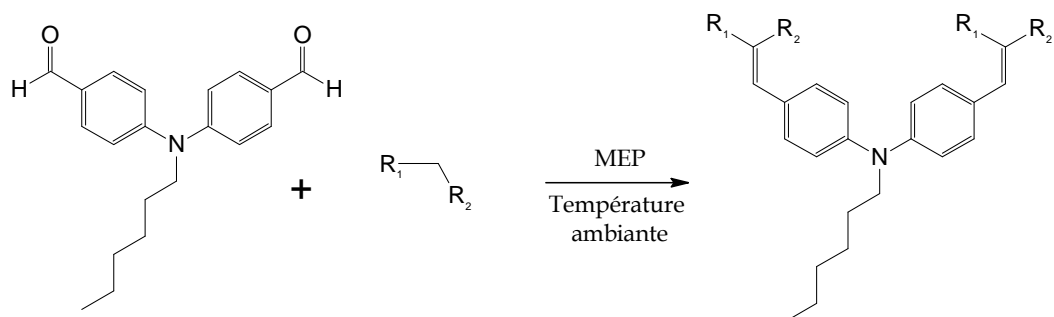


Figure 3 : Synthèse (condensation du type Knoevenagel) de différents chromophores en MEP.

Par ailleurs, des réactions de condensation du type Diels Alder (Imperato *et al.*, 2005; Ilgen *et al.*, 2009a) dans différents mélanges eutectiques formés à partir de polyols en combinaison avec l'urée ou la N,N-diméthylurée (DMU) ont été réalisées. Un rendement quantitatif a pu être obtenu à 71°C dans Fructose:DMU (7:3) en seulement 8 h de réaction. De même, des réactions de couplage de liaison C-C par catalyse métallique du type Suzuki, Heck, Sonogashira ou encore des cycloadditions 1,3-dipolaires du type Huisgen ont été réalisées avec des rendements parfois quantitatifs (Imperato *et al.*, 2006; Ilgen *et al.*, 2009a). En 2006, Imperato *et al.*, ont aussi reporté l'hydrogénation du méthyl alpha cinnamate dans différents mélanges fondus de carbohydrate:urée en présence d'un catalyseur de Wilkinson. Un rendement de réduction quantitatif a même été obtenu dans un mélange acide citrique:DMU (2:3) à 90°C et sous 1 atmosphère de dihydrogène (Imperato *et al.*, 2006). De même, Azizi *et al.* ont reporté la réduction chimio-sélective de dérivés carbonyles fonctionnalisés et d'époxydes dans ChCl:U en présence de NaBH₄ (Azizi *et al.*, 2012b). Une réduction en alcool des dérivés carbonyles a pu être réalisée avec des rendements de 75-99% à

température ambiante en seulement cinq minutes, en utilisant deux équivalents de réducteur. Dans les mêmes travaux, des époxydes de différentes structures ont également pu être réduits avec d'excellents rendements de 75-95% à 60°C en moins de deux heures. Pour conclure, les réactions multicomposant, qui constituent l'un des outils les plus puissants de la synthèse organique ont aussi été réalisées avec succès dans ce type de solvant. Ces méthodes consistent en la synthèse rapide et efficace de structures complexes à partir de substrats très simples (au moins 3) (Gore *et al.*, 2011; Azizi *et al.*, 2012c; Azizi *et al.*, 2012d; Gore *et al.*, 2012). Citons à titre d'exemple la réaction de Biginelli réalisée par Gore *et al.*, dans le MEP acide L-tartrique:DMU (3:7) avec des rendements de 96% pour lequel le MEP joue un triple rôle : solvant, catalyseur et réactant (Figure 4).

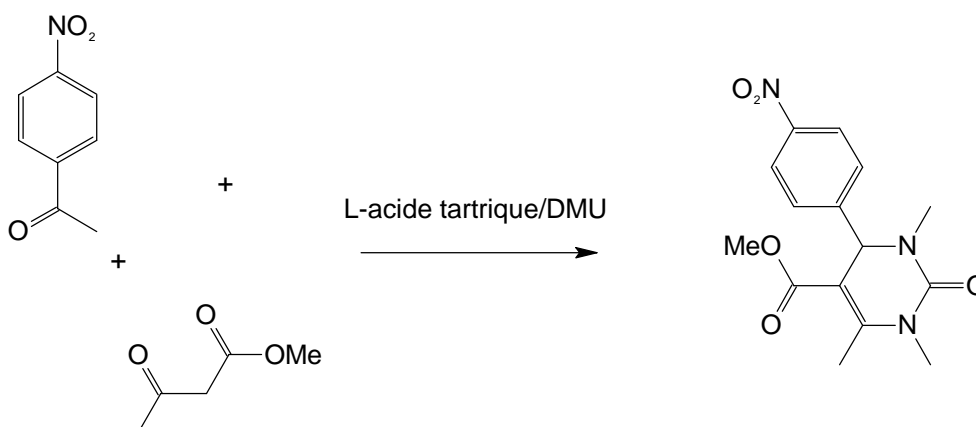


Figure 4 : Réaction multicomposant du type Biginelli dans le MEP acide L-tartrique:DMU (Gore *et al.*, 2011).

Tout aussi intéressante est la possibilité de former un MEP avec les molécules que l'on souhaite faire réagir, l'idée étant de diminuer les températures de fusion des molécules pour une mise en œuvre à l'état liquide. Nous avons vu qu'il était possible, après établissement d'associations intermoléculaires, de diminuer de façon considérable les températures de fusion initiales des composants. Ainsi, Coulembier *et al.* ont réalisé une réaction de copolymérisation après formation initiale d'un mélange eutectique agissant à la fois comme solvant et comme réactif (Coulembier *et al.*, 2012). Ils ont utilisé le lactide et le 1,3-dioxan-2-one comme mélange eutectique

(Tf=21°C, ratio molaire 1:1) à température ambiante en présence d'alcool benzylique comme initiateur et de DBU comme catalyseur. La synthèse de polylactide avec une cristallisation *in situ* a été observée avec succès. De plus, cette méthode permet de contrôler le degré de polymérisation et la taille du polymère à 15 500 g.mol⁻¹.

Le 5-hydroxyméthyl-furfural (HMF) est un composé organique issu de la déshydratation-cyclisation d'hexoses tels le fructose et le glucose. C'est un intermédiaire de synthèse entrant dans la fabrication de composés organiques, matières plastiques ou carburants. A cet égard, un certain nombre de recherches a été entrepris pour réaliser cette synthèse en utilisant des voies réactionnelles hautement efficaces et peu coûteuses. C'est ainsi que plusieurs auteurs ont pu réaliser la déshydratation par catalyse acide d'hexose en utilisant des mélanges eutectiques comme milieu réactionnel (Hu *et al.*, 2008; Ilgen *et al.*, 2009b). Cependant, d'après ces mêmes études, il serait préférable d'utiliser des mélanges eutectiques formés à partir de l'hexose comme donneur de liaison hydrogène. Malgré tout, 76% de rendement peuvent être obtenus en 1h à 80°C dans un mélange eutectique ChCl:acide citrique sans ajout de catalyseur acide avec un ratio MEP/fructose=5. Cette stratégie de synthèse constitue donc une voie réactionnelle hautement efficace et respectueuse de l'environnement. De plus, les MEP associant ChCl à un acide (citrique ou oxalique) permettent la mise au point de système en cascade de dépolymérisation/déshydratation de l'inuline, un biopolymère de fructose, en HMF. Celui-ci peut être obtenu avec des rendements respectifs de 51% et 56% à 80°C en 2 heures (Hu *et al.*, 2009). Dans ce contexte, nul doute que dans un futur proche les MEP pourront être utilisés dans de nombreux procédés de modification des matières premières telle que la biomasse ligno-cellulosique, permettant l'obtention de molécules de base pour la formation de biopolymères, bioplastiques ou biocarburants.

En conclusion, l'utilisation et surtout l'efficacité des mélanges eutectiques comme solvants dans le domaine de la catalyse sont largement documentées dans la littérature. IL est très vraisemblable que le nombre de publications dans les prochaines années ne cessera de croître.

2.5 : Dans les bioprocédés

2.5.1 : En pharmacologie

Nous avons déjà souligné le fait que ces solvants pouvaient être utilisés avec succès pour la dissolution de principes actifs. Une autre application potentielle très prometteuse dans le domaine pharmacologique, est la préparation de nouvelles formulations pharmaceutiques par formation de LTTM ou MEP à partir d'un principe actif. Ainsi, divers auteurs (Bica *et al.*, 2010; Bica *et al.*, 2011; Serrano *et al.*, 2011) mettent en évidence la possibilité de réaliser par liaisons intermoléculaires non-covalentes un complexe entre un principe actif solide et une molécule neutre, l'idée étant de réaliser le plus simplement possible une formulation pharmaceutique après liquéfaction du principe actif. A cet effet, Bica *et al.* en 2011 ont mélangé la lidocaïne (anesthésiant local $T_f=70.3^{\circ}\text{C}$) avec des acides gras de différentes longueurs de chaînes saturées ou insaturées (acides hexanoïque, décanoïque, stéarique, oléique ou linoléique). Des liquéfactions parfois très efficaces de la lidocaïne ont pu être observées sans transfert de proton. Par exemple, en associant ce principe actif à l'acide stéarique ou linoléique dans un ratio molaire 1:1, des réductions du point de fusion de plus de 130°C ont pu être observées. Dans le même esprit, Serrano *et al.* en 2011 ont associé la lidocaïne avec l'octane-1,8-diol dans un ratio 1:1, pour obtenir un point de fusion du mélange de 41.8°C , soit une réduction d'environ 20°C des points de fusion des composants individuels. A terme, ces complexes néoformés pourraient permettre d'améliorer la pénétration membranaire et augmenter l'efficacité du médicament en cas d'administration transdermique.

2.5.2 : Dans les réactions enzymatiques (protéase, époxyde-hydrolase ou estérase)

Par rapport aux autres applications décrites ci-dessus, l'utilisation des mélanges eutectiques comme solvant pour des réactions de biocatalyse n'a été que peu étudiée. Ceci vient peut-être du fait qu'instinctivement l'utilisation de forts

donneurs de liaison hydrogène tels que l'urée, connue pour dénaturer les protéines, n'était peut-être pas envisageable. Cependant, certaines études ont pu révéler un effet positif des MEP en tant que co-solvants dans des réactions biocatalysées d'ouverture d'époxyde. En effet, Lindberg *et al.* ont pu expérimenter l'efficacité de différents MEP à plusieurs concentrations, comme co-solvant dans des réactions d'ouverture du 1R,2R-2-trans-méthylstyrène oxide en diols vicinaux correspondants, en utilisant l'époxyde-hydrolase de pomme de terre (StEH1) (Lindberg *et al.*, 2010). De façon très générale, le MEP a permis d'augmenter significativement les K_m (jusqu'à 20 fois) mais cela n'a eu que très peu d'effet sur le nombre de turnovers (K_{cat}) de l'enzyme. En outre, les MEP permettent de solubiliser 1.5 fois plus de substrats que dans la solution tampon de référence (solution aqueuse de phosphate de sodium 0.1M). En revanche, l'augmentation de la concentration en MEP entraîne une diminution de l'activité résiduelle de l'enzyme. Parmi les MEP utilisés, ChCl:gly s'est révélé être le plus performant en conduisant à une augmentation de la régio-sélectivité tout en minimisant la perte d'activité enzymatique. Des résultats similaires avaient été constatés pour la conversion de l'époxy-styrène par l'époxyde hydrolase de type EHAD1 (Gorke *et al.*, 2009). En effet, l'efficacité de l'hydrolyse de l'époxyde a été considérablement augmentée en ajoutant à la solution aqueuse tamponnée un co-solvant de type ChCl:Gly. De ce fait, la conversion qui était de seulement 4.6% dans le tampon, a été portée à 92% avec l'addition de 25% (v/v) de ChCl:Gly sans aucun changement d'énantiosélectivité. Une addition similaire de solvants organiques (DMSO ou acétonitrile) n'a pas révélé d'augmentation particulière suggérant que l'effet n'était pas simplement lié à l'augmentation de la solubilité du substrat, mais directement aux propriétés intrinsèques du MEP. En revanche, l'ajout de plus de 25% du MEP diminue considérablement son effet positif sur la réaction. En effet, le taux de conversion qui avait atteint 92% avec 25% de MEP comme co-solvant, s'est réduit à seulement 2% avec 50% de MEP.

En outre, les mélanges eutectiques en tant que solvants peuvent être finement adaptés pour accroître l'efficacité des réactions de synthèse par les protéases (Zhao *et al.*, 2011). D'après cette étude, les protéases (subtilisine et α -chymotrypsine) dans des solvants eutectiques profonds à base de ChCl et de glycérol ont une activité et une

sélectivité qui dépendent de la teneur en eau du mélange. Ainsi, une petite quantité d'eau d'environ 5% peut augmenter l'activité enzymatique tout en diminuant la sélectivité. De récents travaux ont pu confirmer l'effet positif d'une faible teneur en eau dans un MEP sur l'activité des protéases (Maugeri *et al.*, 2013). En effet, d'excellents résultats en synthèse peptidique ont été obtenus dans plusieurs MEP à base de ChCl et contenant 10% (v/v) d'eau.

Les MEP se sont révélés être également des co-solvants appropriés pour des réactions d'hydrolyse en solution aqueuse tamponnée, catalysées par des estérases. En effet, l'ajout d'une fraction volumique de 10% à 25% de ChCl:Gly dans un tampon acétate a permis d'améliorer significativement (jusqu'à 3 fois) la vitesse d'hydrolyse enzymatique de l'acétate de *p*-nitrophényle (Gorke *et al.*, 2009). Comme évoqué précédemment avec les époxyde hydrolases, dans des solutions contenant plus de 25% en volume du MEP, l'activité hydrolytique des estérases diminue considérablement.

Ces mises en œuvre de MEP comme co-solvant dans une solution aqueuse tamponnée soulèvent néanmoins une interrogation. En effet, qu'en est-il si l'on compare les effets bénéfiques sur l'activité enzymatique de l'addition de moins de 25% (v/v) de MEP dans une solution aqueuse avec les observations de C. Gutiérrez *et al.* (Gutierrez *et al.*, 2009) pour lesquelles ce dernier révélait qu'un excès d'eau (>50% en masse) dans un MEP entraînait la perte du complexe supramoléculaire caractéristique de ces milieux de telle sorte que cela aboutissait à la formation d'un système équivalent à une simple dilution des composants dans une solution aqueuse ? Peut-on alors réellement parler d'un effet inhérent au mélange eutectique ou d'un effet des molécules simplement diluées dans de l'eau ? A la vue de ces résultats, des études complémentaires seraient grandement utiles pour dissocier et/ou comprendre l'effet intrinsèque des molécules ou du MEP sur l'activité enzymatique.

2.5.3 : Dans les réactions biocatalysées par les lipases

En 2008, l'équipe de Kazlauskas (Minnesota, USA) a été la première à fournir des réponses encourageantes quant à la possible utilisation de ces solvants pour des réactions catalysées par les lipases (Gorke *et al.*, 2008; Gorke *et al.*, 2009). Dans le cadre de ces études, les auteurs ont étudié le potentiel de plusieurs lipases à catalyser la transestérification du valérate d'éthyle par le butanol dans plusieurs MEP (Tableau 9). Parmi elles, la lipase B de *Candida antarctica* présentait l'activité la plus élevée, quel que soit le MEP. Cependant, les meilleurs résultats de bioconversion ont été obtenus dans les MEP ChCl:U et ChCl:Gly. En outre, malgré une viscosité supérieure, les mélanges eutectiques obtenus à partir de sucre et de chlorure de cholinium (ChCl), étaient tout aussi efficaces que le toluène pour effectuer cette synthèse. De plus, des efficacités similaires ont été obtenues pour l'aminolyse du valérate d'éthyle par la butylamine (Tableau 9). Les meilleurs résultats, observés dans les MEP à base de glycérol ou d'urée, étaient cinq fois plus élevés que dans les liquides ioniques (BMIM [BF₄] ou BMIM [Tf₂N]) mais comparables à ceux observés dans le toluène. Ces études ont permis, par ailleurs, de mettre en évidence la bonne stabilité des lipases dans ce type de solvant, stabilité supérieure à celle observée dans les solutions aqueuses des composantes individuelles. Par exemple, une perte d'activité de 75% a été observée après seulement 90 min dans une solution aqueuse d'urée, alors qu'elle était presque négligeable (1%) dans le mélange eutectique ChCl:U. Cette stabilité inattendue a été expliquée par les auteurs par l'important réseau de liaisons hydrogène au sein du MEP, réseau qui abaisse la réactivité des composants du mélange. C'est aussi la raison pour laquelle de très faibles réactivités du donneur de liaison hydrogène ont pu être observées, sauf dans certains cas comme celui de l'éthylène glycol.

Solvant	Alcoololyse (24h)			Aminolyse (4h)
	<i>i</i> CALB ^a	CALA ^b	PCL ^c	<i>i</i> CALB ^a
Toluène	92	76	5	92
ChCl:Acétamide	23	0.5	0	39
ChCl:Glycérol	96	70	22	98
ChCl:Urée	93	1.6	0.8	95
ChCl:Éthylène Glycol	11 (99) ^d	3	0.2	-

^aNovozym 435 (lipase B de *Candida antarctica* immobilisée sur une résine acrylique).

^bRoche chirazyme L-5 (lipase A de *Candida antarctica* lyophilisée).

^cAmano PS (lipase de *Burkholderia* (anciennement *Pseudomonas*) *cepacia* lyophilisée).

^d Le chiffre entre parenthèses est le pourcentage de conversion incluant la réaction secondaire avec l'éthylène-glycol composant le mélange eutectique profond.

Tableau 9 : Conversion du valérate d'éthyle dans des MEP à 60°C en présence de divers enzymes.

Les MEP et les lipases ont également pu être associés avec succès dans la synthèse par ouverture de cycle de polymères comme le polycaprolactone (Gorke *et al.*, 2009). Dans cette même étude les auteurs ont démontré que ChCl:U et ChCl:Gly étaient également de bons co-solvants pour l'hydrolyse lipasique des esters de p-nitrophényle, ou pour des réactions de perhydrolyse de l'acide octanoïque par le peroxyde d'hydrogène. Toutefois, la conversion maximale (22% dans le CHCl:Gly) était beaucoup plus faible que celle obtenue dans le mélange binaire eau-acétonitrile (79%).

Plus tard, Zhao *et al.* (Zhao *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2013) ont confirmé l'intérêt d'utiliser les MEP comme alternative aux solvants organiques ou aux liquides ioniques dans des réactions catalysées par les lipases. Ils ont montré que le MEP à base de chlorure de cholinium et de glycérol pouvait être utilisé comme solvant «vert» de choix pour la préparation de biodiesel par transestérification enzymatique. Ils ont fourni des informations intéressantes sur leur caractère hygroscopique (considérablement plus élevé que les liquides ioniques) et leur viscosité, en fonction de la nature des espèces anioniques et/ou de la teneur en donneur de liaison hydrogène. Dans leurs expériences, les auteurs ont étudié l'influence du ratio molaire

entre le sel et le glycérol sur l'activité et la sélectivité de la lipase. Ils ont constaté qu'une diminution de la teneur en glycérol entraînait une baisse de l'activité lipasique. D'après les auteurs, ce résultat était dû à une plus forte activité thermodynamique des espèces anioniques dans le mélange, entraînant une dénaturation plus importante de l'enzyme. De plus, un screening de différentes lipases a montré que la meilleure activité (sur la réaction de méthanolyse de l'huile de soja) était obtenue avec la lipase B immobilisée de *Candida antarctica* (iCALB), confirmant ainsi les travaux antérieurs de Gorke *et al.*, sur l'efficacité supérieure de cette enzyme dans les MEP (Gorke *et al.*, 2008). Avec cette lipase, de très fortes activités de transestérification enzymatique du sorbate d'éthyle avec le 1-propanol peuvent être obtenues dans différents MEP (Tableau 10), attestant au passage de leur éventuelle supériorité par rapport aux solvants organiques. Enfin, ils ont confirmé la remarquable stabilité de l'enzyme (iCALB) dans un mélange eutectique du type acétate de cholinium (ChOAc) en mélange avec du glycérol (ratio 1:1,5), avec une activité résiduelle de 92% et 50% respectivement après 48h et 168h.

Solvant	Activité ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)
tert-Butanol	0.57
ChCl:Urée	1.00
ChCl:Glycérol	1.12
ChOAc:Glycérol	1.02
ChOAc:Ethylène Glycol	0.07

Tableau 10 : Activité de iCALB lors de la transestérification du sorbate d'éthyle avec le butanol, dans différents MEP à 50°C.

Enfin, Borse *et al.* ont pu accomplir avec réussite des synthèses multi-composantes d'une série de dérivés de la dihydropyrimidine à l'aide de la lipase de *Rhizopus Oryzae* (Borse *et al.*, 2012). Les réactions ont été réalisées dans un MEP du type ChCl:U à 55°C avec des rendements entre 73% et 95% en seulement 6 heures de

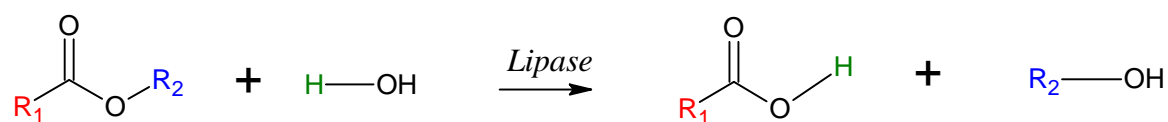
réaction. L'influence du solvant s'est avérée être cruciale et bénéfique pour la réaction. En effet, des rendements plus faibles ont été obtenus en utilisant d'autres milieux réactionnels tels que l'eau, le méthanol, le dioxane ou encore le DMF. De plus, une étude de recyclabilité de l'enzyme a montré que celle-ci pouvait être réutilisée jusqu'à quatre fois sans diminution notable du rendement de la réaction.

3. LIPOPHILISATION BIOCATALYSEE PAR LES LIPASES

3.1 : Généralités sur les lipases

Les lipases ou triacylglycérol acyl-hydrolases (E.C. 3.1.1.3) sont des enzymes atypiques par leur mécanisme d'action et leur spécificité de substrats, qui appartiennent à la famille des hydrolases. Ces enzymes sont principalement connues pour leur rôle dans l'hydrolyse des triglycérides, une étape capitale dans le métabolisme des lipides chez de nombreux êtres vivants. En milieu aqueux, les lipases peuvent également être employées pour l'hydrolyse des phospholipides, des esters de cholestérols ou de sucres, mais aussi pour la résolution de mélanges racémiques pour la production de composés optiquement actifs grâce à leur aptitude à hydrolyser spécifiquement un énantiomère plutôt qu'un autre. En plus de leur capacité naturelle à hydrolyser les esters lipidiques, ces enzymes peuvent également catalyser des réactions de synthèse en phase aqueuse limitée. A ce titre, l'utilisation et le rôle catalytique des lipases en milieu organique ont très largement été étudiés et décrits et ont conduit au développement de nombreuses applications industrielles dans des domaines aussi variés que l'agro-alimentaire, la chimie, la cosmétique ou la pharmacie. Ainsi, les lipases sont des catalyseurs régio-, stéréo- et chimio- sélectifs capables de catalyser plusieurs types de réactions en milieu organique faiblement hydraté tels que l'estérification (réaction entre un acide et un alcool), la transestérification (ester et alcool) et l'interestérification (ester et ester) ainsi que dans des réactions de transfert du groupement acyle d'un ester sur d'autres nucléophiles tels que des amines ou des thiols.

▪ L'hydrolyse :



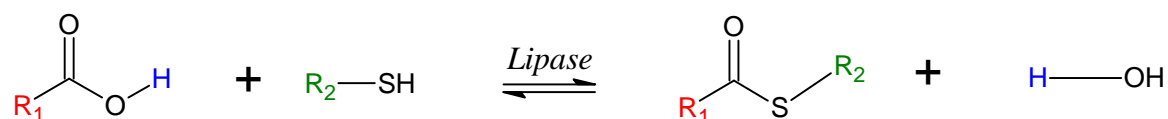
▪ L'estérification :



▪ L'amidation :



▪ La thioestérification :



▪ La transestérification :



Si R_3 = Chaîne carbonée : alcoololyse

R_3 = Un acyle : acidolyse

▪ L'interestérification :



▪ L'aminolyse :



A ce jour, plusieurs centaines de lipases sont répertoriées avec des tailles variables (20KDa à 65KDa) et plusieurs dizaines de structures tridimensionnelles ont pu être déterminées. Bien que les séquences peptidiques montrent peu de similitudes entre elles, principalement à cause de l'hétérogénéité de leurs origines, les lipases présentent dans l'ensemble des structures tridimensionnelles analogues et une activité catalytique proche. C'est ainsi que toutes les lipases connues à ce jour présentent une base structurale composée d'un feuillet Bêta central formé de brins principalement parallèles, reliés entre eux par des hélices alpha. La « machinerie catalytique » se compose essentiellement d'une triade d'acides aminés du type : Serine/Histidine/Glutamique ou Aspartique, entourée d'autres acides aminés intervenant dans la stabilisation du complexe intermédiaire « oxyanion » tétraédrique formé au cours de la catalyse (Ollis *et al.*, 1992).

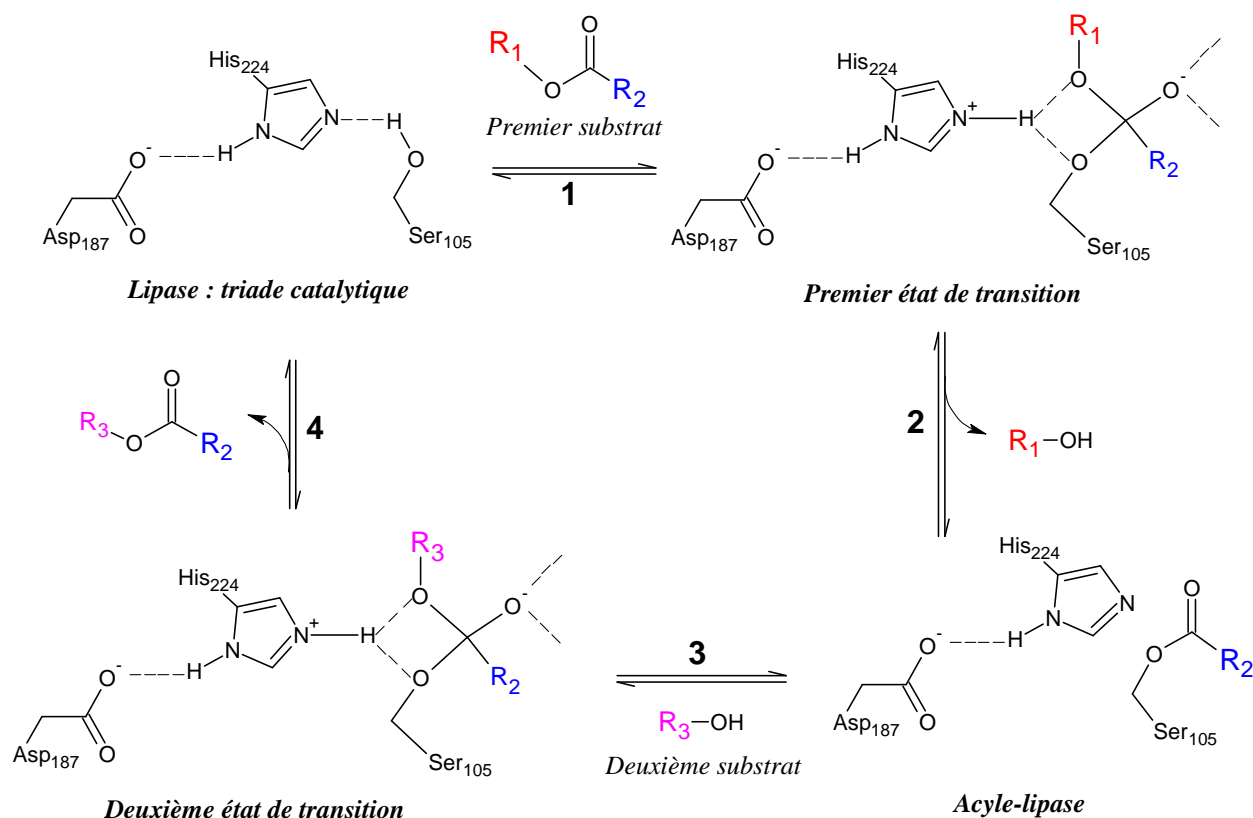
Le mécanisme catalytique se fait en 4 étapes et peut être résumé comme suit (Figure 5) :

1 : Tout d'abord, la serine activée réagit sur le donneur d'acyle entraînant la formation d'un intermédiaire tétraédrique stabilisé par les acides aminés du site actif.

2 : Puis, l'alcool est libéré et un complexe covalent acyle-lipase est formé.

3 : Ensuite, le deuxième substrat nucléophile (eau pour les réactions d'hydrolyse ou alcool, comme dans l'exemple, pour les réactions de trans-estérifications) attaque le centre électrophile activé et donne lieu à un deuxième état de transition : « le trou oxyanionique ».

4 : Enfin, libération du produit après délocalisation électronique et retour de nouveau à la forme active de la lipase.



Avec R1, R2 et R3 des chaînes carbonés ou un hydrogène

Figure 5 : Mécanisme réactionnel de la lipase

Dans la plupart des lipases, le site actif est recouvert par une boucle amphiphile appelée « lid » ou « flap » où la face hydrophobe est orientée vers l'intérieur du site actif ce qui rend l'enzyme inactive sous cette forme (Brady *et al.*, 1990). Des études de cristallographie ont mis en évidence que le passage de l'enzyme vers sa forme active s'accompagne d'un mouvement de ce volet exposant ainsi sa face hydrophobe vers l'extérieur du site créant une surface supposée interagir avec l'interface lipide/eau (Brzozowski *et al.*, 1991; Miled *et al.*, 2000). C'est la raison pour laquelle l'activité catalytique est fortement améliorée quand ces enzymes se trouvent à une interface polaire/apolaire. Cette activation, dite interfaciale, met en jeu un changement conformationnel de leur structure tridimensionnelle au contact d'une surface hydrophobe. Ce contact les rend plus efficaces en catalyse : c'est également ce qui les rend sélectives *in vivo* vis-à-vis de substrats hydrophobes. Grâce à cette particularité et contrairement à d'autres enzymes, l'utilisation des lipases en milieu hétérogène

permet souvent d'améliorer leur efficacité. Cependant, ce phénomène d'activation a été remis en cause récemment dans une étude de modélisation moléculaire et de cristallographie aux rayons X sur la lipase A de *Candida antarctica* qui mettait en évidence un mécanisme plus complexe (Ericsson *et al.*, 2008).

La polyvalence réactionnelle (ou promiscuité catalytique) des lipases, ainsi que leur adaptabilité, leur confèrent une place de choix dans de nombreuses applications industrielles. Ceci est principalement dû au fait que les lipases exercent une très bonne activité dans les milieux non aqueux en acceptant une très grande diversité de substrats. Les lipases peuvent être utilisées sous leur forme native (poudre ou liquide). Cependant, pour accroître leur viabilité et leur recyclabilité dans les procédés industriels tout en minimisant les problèmes d'inactivation (enzyme libre) et de séparation du produit *in fine*, des formulations spécifiques peuvent être réalisées. L'approche la plus courante consiste en leur immobilisation sur une matrice inerte appropriée. Souvent cette étape permet d'augmenter la stabilité chimique et thermique du biocatalyseur. Cela peut également entraîner des changements (bénéfiques ou non) au niveau de l'activité enzymatique, du pH optimum, et de l'affinité pour les substrats (Balcão *et al.*, 1996; Ivanov *et al.*, 1997; Villeneuve *et al.*, 2000). Ces changements sont fonction de la technique d'immobilisation utilisée, de la nature du support mais aussi de sa granulométrie. Les différentes méthodes d'immobilisation, schématisées ci-dessous (Figure 6), comportent chacune des avantages et des inconvénients.

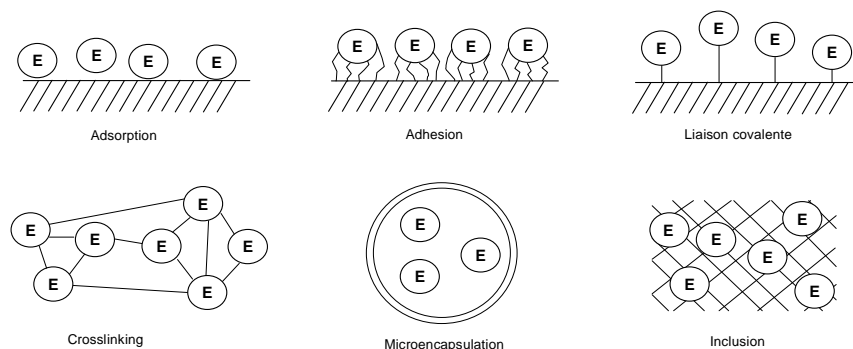


Figure 6 : Les différentes techniques d'immobilisation d'enzymes (Buchholz K, Kasche V, Bornscheuer UT, 2005).

En outre, dans le but de ne pas mélanger l'enzyme libre au(x) substrat(s) et de réutiliser l'enzyme, des réactions en continu dans des réacteurs ont fait l'objet de nombreuses études (Hilal *et al.*, 2006; Tan *et al.*, 2010). Pour cela, l'enzyme libre ou immobilisée est emprisonnée à l'intérieur d'une membrane au travers de laquelle passe le substrat. Il existe plusieurs types de réacteurs à membrane: les réacteurs à membrane porteuse d'activité et les réacteurs à membrane sans activité.

Comme nous l'avons mentionné plus haut, les meilleures activités lipasiques dans les MEP sont obtenues avec la lipase B synthétisée par la levure *Candida antarctica*. Cette levure a la particularité de synthétiser deux types de lipases (A et B) différentes d'un point de vue structural. La forme B, celle que nous utiliserons quasi exclusivement durant ces travaux de thèse, est une enzyme recombinante immobilisée sur une résine acrylique macroporeuse et produite à l'échelle industrielle par Novo Nordisk (Danemark). Elle est constituée de 317 acides aminés avec un poids moléculaire de 33KDa. Cette enzyme se différencie des autres lipases par le fait qu'elle possède une faible activité vis-à-vis des triglycérides à longues chaînes et qu'elle n'est pas tributaire du phénomène d'activation interfaciale. Elle est donc considérée comme une enzyme intermédiaire entre une lipase et une estérase (Uppenberg *et al.*, 1994; Uppenberg *et al.*, 1994; Verger, 1997).

3.2 : Paramètres influençant la réactivité lipasique

L'utilisation des lipases dans les procédés de synthèse nécessite la bonne compréhension et la maîtrise de plusieurs facteurs. C'est pourquoi cette section aura pour objectif la description et l'explication des paramètres influant sur l'activité lipasique, afin d'obtenir les meilleurs rendements et vitesses de réaction.

3.2.1 : Le milieu réactionnel

Le choix du solvant est sans doute l'une des étapes les plus importantes lorsque l'on souhaite effectuer une réaction en milieu non aqueux. En effet, ce choix est généralement un compromis qui doit satisfaire à plusieurs prérogatives sans pour autant perdre de vue l'objectif principal qui est la réussite de la réaction. Ainsi, le milieu réactionnel doit permettre à la fois une bonne solubilisation des substrats et le maintien de l'activité enzymatique. D'autres critères tels que l'extraction et la séparation des produits de réaction, mais aussi la toxicité du solvant peuvent être déterminants si d'aventure la réaction est utilisée pour la synthèse de molécules à usages pharmaceutique, cosmétique ou alimentaire. La plupart des réactions utilisant les lipases comme biocatalyseurs sont essentiellement mises en œuvre en solvants organiques ou en milieux fondus. Cependant, d'autres méthodes visant à améliorer les rendements de synthèse tout en diminuant l'impact de certains solvants ont été développées. A cet égard, les liquides ioniques ou le dioxyde de carbone supercritique ont été envisagés comme alternative aux milieux réactionnels classiques.

Les solvants organiques :

Ce type de solvant est sans doute à l'heure actuelle le milieu réactionnel le plus utilisé pour réaliser des réactions de bioconversion. Ces solvants, seuls ou en mélange, offrent de multiples avantages et permettent de mettre au point des systèmes réactionnels hautement efficaces. Sans aucun doute, l'atout majeur de ces

solvants réside en leur capacité à dissoudre une très large gamme de composés de polarité différente. Ces solvants sont, pour la plupart, chimiquement inertes vis-à-vis des réactions enzymatiques, et peuvent, selon leur nature, influencer considérablement l'activité, la sélectivité et la spécificité du biocatalyseur. Par ailleurs, ces milieux possèdent des températures de fusion relativement faibles ce qui leur permet d'être facilement éliminés en fin de réaction et de faciliter la récupération des produits finaux. Cependant, il est difficile d'affirmer si la forte pression de vapeur saturante d'un solvant est un avantage ou un inconvénient car cela dépendra de l'application envisagée. En revanche, leur toxicité (à l'origine de l'émergence de nouveaux solvants) mais aussi leur inflammabilité représentent un sérieux frein à leur utilisation, tout particulièrement dans l'industrie. En effet, même si un solvant peut parfois conduire à de meilleurs rendements et de meilleures cinétiques de réaction, son usage peut être proscrit en raison de sa forte toxicité. Citons à titre d'exemple la pyridine, un des premiers solvants utilisés en synthèse lipasique (Therisod e Klibanov, 1986; Mutua *et al.*, 1993) qui fut très vite abandonné du fait de sa forte toxicité.

Concernant leur utilisation en biocatalyse, les nombreuses études ont montré que, parmi leurs principales caractéristiques physico-chimiques (l'hydrophobicité, le moment dipolaire, la constante diélectrique, ou bien encore la taille de la molécule du solvant mesurée par son rayon de Van der Waals), l'hydrophobicité était l'élément déterminant de l'activité catalytique des lipases. Ce dernier peut être exprimé en utilisant le LogP, qui est défini comme le logarithme du rapport des concentrations du composé à étudier dans l'octanol et dans l'eau. Le LogP des principaux solvants organiques utilisés en catalyse lipasique est indiqué dans Tableau 11 ci-dessous.

Solvants	logP	Solvants	logP
Heptane	+ 4,0	Tétrahydrofurane	+ 0,5
Hexane	+ 3,5	Acétone	- 0,3
Toluène	+ 2,5	Acétonitrile	- 0,4
Benzène	+ 2,0	Ethylméthyl cétone	- 0,8
2-Méthyl-2-butanol	+ 1,3	Diméthyl formamide	- 1,0
tert-Butanol	+ 0,8	Dioxane	- 1,1
Pyridine	+ 0,7	Diméthylsulfoxyde	- 1,3

Tableau 11 : LogP des principaux solvants utilisés en synthèse lipasique

En outre, une corrélation entre l'hydrophobicité du solvant définie par son LogP et l'activité des lipases a pu être établie. Il en ressort que plus le LogP est grand, meilleure est l'activité et la stabilité de l'enzyme. Ainsi, on observe une faible activité dans les solvants dont le LogP est inférieur à 2, une activité modérée dans ceux ayant un LogP entre 2 et 3 et la meilleure activité dans les solvants dont le LogP est supérieur à 3 (Laane *et al.*, 1987).

Autrement dit, l'activité catalytique initiale et résiduelle du biocatalyseur est d'autant plus forte que le solvant est hydrophobe. L'influence négative de l'augmentation de l'hydrophilie du milieu sur l'activité et la stabilité enzymatique est due à un phénomène de compétition entre le solvant et l'enzyme par rapport à l'eau. En effet, cette compétition a un impact direct sur la couche d'hydratation de la protéine enzymatique nécessaire à son bon fonctionnement catalytique, ce qui, en cas de déformation peut affecter son activité (Valivety *et al.*, 1992; 1994). De fait, il en résulte que plus un solvant sera hydrophile (particulièrement dans le cas des solvants protiques) et sa capacité à piéger les molécules d'eau importante, plus grande pourra être la déstabilisation de la structure protéique. Malheureusement, les solvants très hydrophobes (LogP positif élevé) ne sont en général peu ou pas appropriés à la conversion de molécules hydrophiles. Il va de soi que la solubilisation même partielle des substrats, est une condition *sine qua non* à toute bioconversion et peut devenir limitante lorsqu'il s'agit de modifier un substrat polaire tel que sucres, acides

phénoliques, acides aminés ou encore petits peptides. En effet, dans les solvants hydrophobes comme l'hexane, où les lipases exercent leur meilleure activité, ces composés ont une très faible solubilité. En revanche, dans les milieux hydrophiles (qui plus est protiques), ces substrats ont une bonne solubilité mais les lipases sont désactivées ou présentent une faible activité. Pour résoudre ce problème, différentes alternatives peuvent être mises en œuvre comme l'utilisation de mélange de solvants ou des solvants de LogP intermédiaire. A cet égard, les alcools tertiaires sont de bons candidats, d'une part parce qu'ils n'entrent pas en compétition avec les substrats dans la réaction et, d'autre part, parce que leur élimination en fin de réaction ne présente pas de difficulté particulière. Bien que l'on observe une dénaturation précoce de l'enzyme dans les solvants à faible valeur de Log P, ces derniers peuvent néanmoins être employés et plusieurs exemples dans la littérature font état de bioconversions dans ces milieux. Ainsi, des réactions dans l'acétonitrile (Ljunger *et al.*, 1994; Bagi e Simon, 1999), le tert-butanol (Ku e Hang, 1995), le 2-méthyl-2-butanol (Khaled *et al.*, 1991; Villeneuve *et al.*, 2002) ou encore dans l'acétone (Yan *et al.*, 1999) ont pu être réalisées.

En conclusion, il est difficile de remettre en cause la capacité et le potentiel qu'ont les solvants organiques à être mis en œuvre dans des réactions biocatalysées par les lipases. Cependant, les difficultés rencontrées lors de la modification de substrats polaires additionnées à la dangerosité des solvants organiques (inflammabilité, pollution, toxicité etc.) légitiment l'émergence de nouveaux milieux réactionnels et la nécessité de trouver des alternatives plus performantes.

Les liquides ioniques:

Les liquides ioniques (LI) sont des sels liquides se différenciant de l'ensemble des sels fondus par une température de fusion inférieure à 100°C (arbitrairement fixée en référence à la température d'ébullition de l'eau), un grand nombre d'entre eux étant liquides à température ambiante. Les LI sont constitués d'un cation, le plus souvent organique, associé à un anion organique ou inorganique. Les cations, sont des

ammoniums ou phosphoniums quaternaires généralement volumineux et dissymétriques (tétraalkylammoniums, tétraalkylphosphoniums, alkylpyridiniums, triazoliums, pyrrolidiniums ou imidazoliums) diversement substitués (Figure 7).

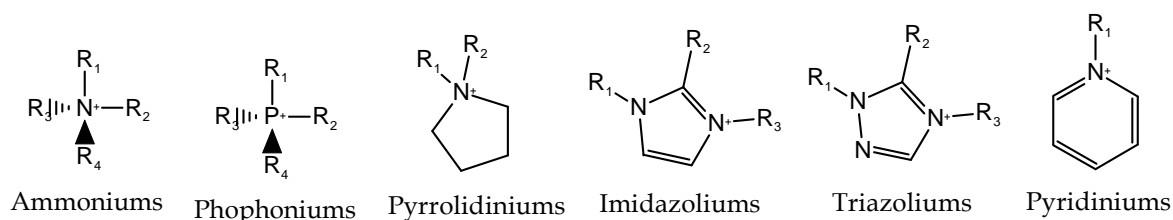


Figure 7 : Diversité structurale des cations constituant les liquides ioniques.

Actuellement, de nombreux cations ont pu être fonctionnalisés par des groupements amines, alcools ou éthers, acides carboxyliques ou esters, thiols, vinyl, allyl, alcynes ou encore nitriles. Les anions utilisés peuvent être de nature organique ou inorganique, avec des tailles et des propriétés d'électronégativités ou de polarisabilités très différentes (Figure 8).

Anions inorganiques	Anions organiques
F ⁻ , Cl ⁻ , BF ₄ ⁻ , PF ₆ ⁻ , ClO ₄ ⁻ , CuCl ₂ ⁻ , SnCl ₃ ⁻ , ...	CH ₃ CO ₂ ⁻ , CF ₃ CO ₂ ⁻ , CF ₃ SO ₃ ⁻ , R ₃ BOH ⁻ , ...

Figure 8 : Diversité des anions constituant les liquides ioniques.

La richesse des combinaisons anions/cations possibles (>10⁶) et la variation de la nature des substituants portée par le cation sont des atouts majeurs qui offrent la possibilité d'ajuster les caractéristiques physico-chimiques du milieu. En conséquence, les liquides ioniques sont capables de dissoudre un grand nombre de composés inorganiques ou organiques de polarité très différente. Leur utilisation en tant que solvant de réaction présente de nombreux avantages en raison d'un large domaine de stabilité thermique et chimique à l'état liquide. De plus, ce sont de bons

conducteurs (de 0,01 à 1,5 S/m) avec une très faible pression de vapeur saturante, ainsi qu'une haute capacité calorifique. Certains liquides ioniques peuvent être totalement non-volatils jusqu'à leur température de décomposition (typiquement au-dessus de 300°C) tout en restant ininflammables. Ainsi, ils présentent un risque considérablement réduit de rejet de vapeurs dans l'atmosphère. Néanmoins, l'utilisation des liquides ioniques en tant que milieux réactionnels pour des synthèses chimiques ou enzymatiques se heurte à de nombreux problèmes. La toxicité des LI (qui est pour le moment très mal connue et fortement discutable et discutée (Ranke *et al.*, 2004; Stolte *et al.*, 2006; Ranke *et al.*, 2007) mais aussi et surtout le prix de revient élevé de ces produits sont autant de facteurs limitant leur développement à l'échelle industrielle. Concernant les données toxicologiques, il est avéré que les sels d'imidazolium sont d'autant plus (éco-) toxiques que la chaîne alkyle est longue (Jastorff *et al.*, 2005). De plus, apparaissent également des limitations dues à la nature intrinsèque des LI telles qu'une viscosité importante, une solubilité des gaz très faible, mais aussi et surtout des difficultés de synthèse suivies d'une purification inéluctable et fastidieuse. Ce dernier aspect est probablement un des principaux obstacles à l'utilisation des LI car les impuretés présentes sont généralement difficiles à éliminer et peuvent fortement altérer les propriétés physico-chimiques de ces milieux (Seddon *et al.*, 2000; Noda *et al.*, 2001; Magna *et al.*, 2003). Par conséquent, un grand soin doit être apporté à la synthèse (généralement en 2 étapes : quaternisation de l'hétéroatome + échange d'anion) des LI afin de limiter autant que faire se peut les impuretés présentes dans le solvant final, notamment les traces d'eau, d'halogénures et de cation de départ.

Concernant leur utilisation dans le domaine de la biocatalyse, ces solvants permettent généralement d'accroître la sélectivité enzymatique et la thermo-résistance de l'enzyme tout en préservant l'activité de l'enzyme (Van Rantwijk *et al.*, 2003). De ce fait, leur utilisation comme solvant réactionnel pour la synthèse biocatalysée par les lipases, n'a cessé de s'accroître ces vingt dernières années. A titre d'exemple, nous pouvons citer les synthèses des sucro-esters (Ganske e Bornscheuer, 2005; Lee *et al.*, 2008) ou la lipophilisation des composés phénoliques (Katsoura *et al.*,

2009; Yang *et al.*, 2012). Cependant, des études révèlent que les liquides ioniques peuvent aussi être néfastes à la stabilité enzymatique (Lau *et al.*, 2004).

En conclusion, les liquides ioniques présentent des propriétés physico chimiques originales par rapport aux autres solvants classiquement rencontrés en chimie. Leur adaptabilité et leur versatilité peuvent conduire à des solutions élégantes pour résoudre des problèmes de procédés. Le monde industriel s'intéresse depuis longtemps à ces solvants et plusieurs procédés sont désormais opérationnels ou au stade pilote avec des résultats qui dépassent souvent les attentes. C'est le cas du procédé BASIL développé par BASF (Olivier-Bourbigou *et al.*, 2010), ou bien encore le procédé de dimérisation du butène en octène créé par l'IFP sous le nom de DIFASOL (Maase *et al.*, 2005). Cependant, la généralisation de l'utilisation de ces solvants est profondément liée à des impératifs économiques, et les liquides ioniques sont pour l'instant des composés coûteux avec des difficultés de synthèse avérées. C'est la raison pour laquelle, nous pensons qu'actuellement l'utilisation de ces solvants ne sera envisageable uniquement pour la synthèse de produits à haute valeur ajoutée.

Les milieux fondus:

Dans les procédés mis en œuvre en milieu fondu le rôle de solvant est assuré par l'un des réactifs de la réaction, ce dernier faisant office à la fois de réactant et de milieu réactionnel. De tels procédés permettent de s'affranchir de l'utilisation de solvants organiques classiques et, en ce sens, permettent de développer des voies réactionnelles plus respectueuses de l'environnement. Dans les réactions de lipophilisation, les milieux fondus sont généralement obtenus par excès du substrat le plus hydrophobe (acide ou alcool aliphatique) qui permet bien souvent une faible dégradation de l'activité catalytique des lipases. De plus, l'excès d'un des réactifs peut jouer un rôle favorable sur l'équilibre thermodynamique de la réaction, en le déplaçant dans le sens favorable de la synthèse. De nombreuses réactions peuvent être effectuées avec succès en utilisant ce type de méthodologie. Citons à titre d'exemple les travaux de lipophilisation par alcohydrolyse du chlorogénate de méthyle en milieu fondu, en utilisant des alcools de différentes longueurs de chaîne (du

butanol à l'hexadecanol) mises au point par López Giraldo *et al.* (Lopez-Giraldo *et al.*, 2007). Cependant, ce procédé ne présente pas que des avantages. En effet, le premier inconvénient limitant son utilisation réside dans le fait que le substrat, jouant le rôle de solvant, doit être liquide à la température à laquelle l'on souhaite effectuer la réaction. Ainsi, certains substrats ne pourront pas être liquides à des températures compatibles avec une activité enzymatique optimale. De plus, il est également important de tenir compte de la nature des substrats et de leur solubilité dans le milieu fondu. En effet, une trop grande différence de polarité entre les substrats entraînera indéniablement un problème de solubilité de l'un dans l'autre. C'est le cas des réactions de lipophilisation où il apparaît des difficultés lorsqu'il s'agit de solubiliser des substrats polaires (sucres ou acides phénoliques) dans des alcools ou acides gras. Dans ce même type de réaction, l'utilisation de quantité de substrat en très large excès pourrait entraîner des problèmes de transferts de masse vers le site actif de l'enzyme, ralentissant considérablement les cinétiques.

Néanmoins, il apparaît clairement que la mise en œuvre de procédés enzymatiques en milieu fondu peut être une alternative de choix en accord avec les exigences environnementales concernant la synthèse de biomolécules à intérêt thérapeutique, agroalimentaire ou cosmétologique.

Les fluides supercritiques:

Le fluide supercritique demeure l'un des plus prometteurs solvants néotériques pour la synthèse enzymatique. En particulier le dioxyde de carbone (CO_2) pour lequel l'utilisation comme milieu réactionnel dans son état supercritique (ScCO_2) pour des réactions de biotransformation a été décrit pour la première fois en 1985 par Hammond *et al.* (Hammond *et al.*, 1985). Le dioxyde de carbone a la particularité de posséder une zone critique aisément accessible qui permet un maintien de l'activité enzymatique. En effet, le point critique du CO_2 s'obtient à une température de seulement 31.1°C et pour une pression de 73.8 Bars (Figure 9).

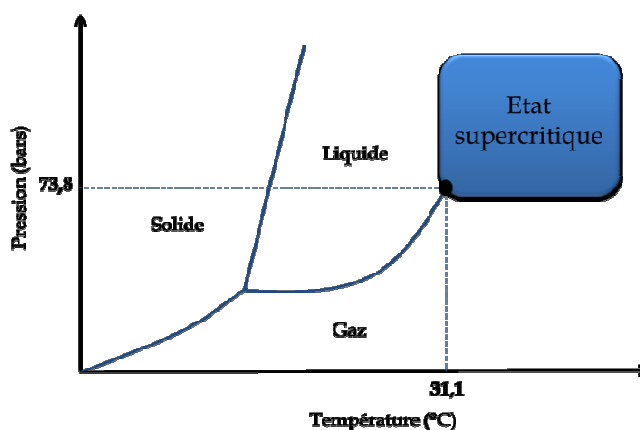


Figure 9 : Diagramme de phase du dioxyde de carbone.

Ainsi pour des valeurs de température et de pression supérieures le CO₂ existe dans un état dit « supercritique » où il possède des propriétés intermédiaires entre celles d'un liquide et celles d'un gaz. Un avantage majeur dans l'utilisation des fluides supercritiques en biocatalyse est la flexibilité des propriétés de solvant. En effet, dans ce type de système les propriétés physiques du fluide peuvent considérablement varier par le simple changement de la pression et/ou de la température. Ces variations même légères, peuvent modifier de façon très significative la viscosité, la masse volumique et la capacité de dissolution du fluide et avoir un impact sur les sélectivités des catalyses enzymatiques (Beckman, 2004; Celia *et al.*, 2005; Yasmin *et al.*, 2006). Le ScCO₂ possède un moment dipolaire proche du pentane ou de l'hexane et permet de solubiliser des composés apolaires de faible poids moléculaire. L'utilisation de ScCO₂ en tant que milieu réactionnel permet de mettre au point des systèmes catalytiques d'une haute sûreté (non-toxique, non inflammable, basse température et inodore). Les propriétés de transports des fluides sensiblement supérieures à celles des liquides induisent une meilleure diffusion des substrats et en ce sens peuvent améliorer les performances de la réaction. De plus, la récupération des produits *in fine* n'est pas un sujet de préoccupation. En effet, la variation des conditions de réaction (pression et/ou température) peut permettre une récupération sélective des composés. Ainsi, de nombreux travaux utilisant la catalyse lipasique dans ce type de solvant néotérique ont très largement été étudiés et plusieurs rapports ont été publiés en ce qui concerne l'application des enzymes telles que les

lipases dans ce type de fluide (Knez, 2009; Ramsey *et al.*, 2009). Par exemple, Romero *et al.* ont rapporté que les vitesses initiales de synthèse de l'acétate d'isoamyle en ScCO₂ en présence des lipases de *Candida rugosa* ou de *Rhizomucor miehei* étaient supérieures à celles effectuées dans des milieux conventionnels (solvants organiques) (Romero *et al.*, 2005). L'amélioration de la diffusivité des réactifs en milieu supercritique est responsable des différences de cinétique. Par ailleurs, l'ajout de co-solvants en proportion volumique considérable (1-20%) a été rapporté pour améliorer les cinétiques et rendements de la réaction. L'addition d'un co-solvant tel que l'acétone ou l'éthanol augmente la polarité du système réactionnel, ce qui permet la mise au point de synthèse de composés hydrophiles. Par exemple, l'estérification de l'acide palmitique par le glucose, en milieu biphasique ScCO₂-acétone et en présence de la lipase B immobilisée de *Candida antarctica*, permet la formation du glycolipide correspondant, malgré un faible rendement de l'ordre de 25% (Lozano, 2010). L'utilisation de ScCO₂ en mélange avec des liquides ioniques a été aussi très largement étudiée avec une amélioration des activités enzymatiques (Lozano *et al.*, 2006; Habulin *et al.*, 2007). Cependant, pour certains travaux, l'addition de co-solvants n'a pas eu d'effet significatif sur la vitesse et les rendements de la réaction (Dhake *et al.*, 2011). En outre, un important point à considérer quand on réalise des réactions biocatalytiques dans un réacteur de fluide supercritique c'est de prendre des précautions particulières pendant la pressurisation et la dépressurisation du gaz dans le milieu réactionnel. Une vitesse de dépressurisation trop importante peut accroître dans ce cas l'élimination de l'eau à la surface de l'enzyme et entraîner un changement conformationnel de sa structure et affecter son activité catalytique (Eisenmenger e Reyes-De-Corcuera, 2009; Dhake *et al.*, 2011).

3.2.2 : L'activité thermodynamique de l'eau (a_w)

L'eau est une petite molécule aux propriétés uniques, comparée à d'autres composés de masses molaires voisines (ammoniac ou méthane). En effet, elle est la seule à être sous sa forme liquide dans la gamme de température du monde vivant (0

à +100°C), avec un point d'ébullition élevé et une chaleur de vaporisation importante. Ces caractéristiques sont liées à sa capacité à former des liaisons hydrogène induisant une grande organisation des molécules entre elles. En effet, dans cette molécule (de formule brute H_2O), deux paires d'électrons sont engagées dans les 2 liaisons O-H et l'oxygène possède deux paires d'électrons libres. Dans un arrangement parfait les deux liaisons covalentes et les doublets libres forment un tétraèdre avec des angles entre les différentes paires de 109,47°. Cette structure permet à l'eau de former des liaisons hydrogène, de nature électrostatique entre un atome électronégatif (anion) et un atome d'hydrogène. Une molécule d'eau peut former donc au plus quatre liaisons hydrogène : deux avec les doublets électroniques et deux avec les deux atomes d'hydrogène. Ainsi, de par son moment dipolaire et les liaisons hydrogène qu'elle peut former, l'eau possède une constante diélectrique importante (78,5 D) et une tension de surface très élevée (72 dynes/cm) qui en font un solvant polaire exceptionnel. Outre sa capacité à former des liaisons hydrogène, l'eau peut établir des interactions dipôle-dipôle et intervient dans la formation de liaisons de faible énergie, comme par exemple les forces de Van der Waals. De plus en s'ionisant, elle peut participer à des interactions du type ionique.

La disponibilité de l'eau et sa susceptibilité d'intervenir dans une réaction sont données par une mesure d'activité thermodynamique de l'eau notée a_w . L'activité de l'eau (a_w) d'une solution aqueuse homogène est définie par le rapport de la pression de vapeur de l'eau dans la solution (P) et la pression de vapeur de l'eau pure (P_0) à la même température. Dans le cas des produits solides, l'activité de l'eau rend compte globalement de l'intensité avec laquelle l'eau est associée à l'ensemble des autres constituants du produit. Elle renseigne sur la disponibilité de l'eau pour participer à des propriétés fonctionnelles dans le milieu. Pour mesurer l' a_w d'un produit, on attend que la pression de vapeur de l'eau dans le produit, placé dans une enceinte à température et humidité relative contrôlées, soit en équilibre thermodynamique avec la pression partielle de la vapeur d'eau dans l'air. L' a_w peut être déterminée par des méthodes directes (manométriques), qui consistent à mesurer la pression partielle de vapeur d'eau dans l'atmosphère en équilibre avec le produit, ou par des méthodes indirectes, pour lesquelles la variable mesurée est corrélée à la pression partielle de

vapeur d'eau dans l'atmosphère (humidité relative, température de rosée...). La méthode la plus appropriée à la mesure de l' a_w des produits alimentaires solides est la méthode gravimétrique. Elle consiste à mettre le produit en équilibre avec l'atmosphère dans une micro-enceinte à température constante contrôlée. Lorsque l'équilibre entre la pression de vapeur d'eau dans le produit et la pression partielle de vapeur d'eau de l'enceinte est effectivement réalisé, le potentiel chimique de l'eau est identique dans le gaz et dans le produit. L' a_w est déterminée par la relation :

$$a_w = \frac{\text{HRE}(\%)}{100}$$

avec HRE (%) : humidité relative à l'équilibre

En outre, l'activité de l'eau d'un produit peut être reliée à sa teneur en eau à une température donnée par l'isotherme de sorption. Cette relation renseigne sur le comportement hygroscopique du produit.

Par sa capacité à être impliquée dans des interactions très variées, l'eau est d'une importance capitale pour l'organisation tridimensionnelle des macromolécules, et plus particulièrement pour les enzymes dont les activités catalytiques sont étroitement liées à sa structure. Les molécules d'eau interagissent de façon privilégiée avec les résidus chargés et avec les résidus polaires des protéines et contribuent à la stabilité de la structure protéique. Elles sont localisées soit en surface des protéines, soit dans les cavités internes des molécules protéiques ou encore associées à des ions métalliques liés à la protéine. Les molécules d'eau sont engagées dans de multiples liaisons hydrogène et apportent la mobilité conformationnelle indispensable à l'activité enzymatique. La conformation moyenne qu'adopte une protéine en solution aqueuse est le résultat des interactions qui s'établissent entre les groupements ionisés ou polaires des molécules protéiques et l'eau. Ainsi, l'eau associée à la protéine est essentielle et aura un effet sur la polarité de son site actif, sur sa flexibilité et sur l'équilibre thermodynamique de la réaction. Toutefois, dans le cas spécifique qui nous concerne, à savoir les réactions d'interestérification ou de transestérification biocatalysées par des hydrolases de type lipases, l'eau peut aussi intervenir comme un substrat nucléophile compétitif. Il est donc primordial de maîtriser et contrôler la

présence de l'eau qui peut avoir un effet néfaste sur la cinétique et le rendement de la réaction. En d'autres termes, une trop faible teneur en eau entraînerait une rigidification de la protéine induisant alors son inactivité (Klibanov, 1997; 2001) et à l'inverse, un excès de molécules d'eau proche du site actif donnerait lieu à des réactions d'hydrolyses compétitives (Valivety *et al.*, 1992; 1994) et constituerait une barrière diffusionnelle pour les substrats hydrophobes. Maîtriser la teneur en eau pour définir les conditions réactionnelles optimales favorisant les transferts d'acyles au détriment des réactions compétitives d'hydrolyse est d'une importance cruciale. C'est pourquoi il est impératif de contrôler l' a_w en début ou en cours de réaction. Pour ce faire, il existe diverses méthodes dont la plus employée est basée sur l'utilisation de solutions salines saturées au-dessus desquelles l'humidité relative est déterminée par la nature du sel. Grâce à ces procédés, il est possible d'ajuster l' a_w des enzymes et des substrats aussi bien au début qu'en cours de réaction (Svensson *et al.*, 1994; Dudal e Lortie, 1995). D'autres méthodes préconisent l'utilisation de membranes en silicone contenant des sels saturés (Kaur *et al.*, 1997), des tubes de silicone semi-perméables (Wehtje *et al.*, 1997; Petersson *et al.*, 2007), ou bien encore d'équilibrer le milieu réactionnel avec un débit d'air préalablement équilibré avec une solution saline saturée (Won e Lee, 2002). Notons aussi que pour limiter cette réaction indésirable d'hydrolyse et piéger l'eau générée au cours d'une réaction l'ajout de tamis moléculaire ou la réalisation de procédés sous pression réduite peut être facilement envisagé.

En conclusion, l'activité thermodynamique de l'eau peut considérablement influencer les réactions lipasiques en milieu non aqueux. Elle peut avoir un impact sur les cinétiques mais aussi sur les sélectivités de la réaction mise en jeu. Ainsi, de nombreuses études ont mis en évidence la nécessité d'une a_w initiale du solvant organique inférieure à 0.1 pour que l'acylation enzymatique soit optimale (Humeau *et al.*, 1998; Chamouleau *et al.*, 2001). De même, dans l'exemple relatif à l'aptitude des lipases du latex de *Carica papaya* à biocatalyser la réaction d'alcoololyse entre la trilaurine et le butanol, plusieurs essais ont été conduits avec diverses préparations enzymatiques, pré-équilibrées à différentes valeurs d' a_w comprises entre 0 et 1 (Caro *et al.*, 2002). Dans ce cas particulier, la formation optimale des esters a été obtenue

avec un biocatalyseur pré-équilibré à une valeur d' a_w de 0,22. Pour des valeurs d' a_w supérieures à 0,22, une décroissance graduelle dans les rendements est observée, signe d'une activité hydrolytique apparente. Des rendements quasiment nuls pourront même être observés pour une estérification conduite à une a_w de 0,7. Il est bien important d'avoir à l'esprit que, pour une réaction choisie, toutes les lipases n'auront pas une a_w optimale identique. En revanche, pour une lipase sélectionnée l' a_w permettant une activité optimale de l'enzyme pourra être la même quelle que soit la réaction mise en jeu (Wehtje *et al.*, 1997).

En conclusion, dans les réactions de biotransformation biocatalysée par une lipase, l'eau peut être indifféremment un substrat, un produit ou un solvant de la réaction en fonction de sa disponibilité pour l'enzyme. Elle peut agir comme un fluidifiant et augmenter l'activité enzymatique, ou comme un second substrat et diminuer les sélectivités. En conséquence, le rôle de l'eau en synthèse lipasique sera d'une importance cruciale et pourra souvent expliquer des différences d'activités et de réactivités alors qu'aucun autre paramètre du système ne varie.

3.2.3 : Le pH

Le pH de la solution peut avoir plusieurs effets sur la structure et l'activité des enzymes. Par exemple, le pH peut avoir un effet sur l'état de l'ionisation basique ou acide des acides aminés en influant principalement sur les groupes fonctionnels carboxyles ou amines de leurs chaînes latérales. Si l'état d'ionisation des acides aminés dans une protéine est modifié cela implique que les liaisons ioniques qui permettent de déterminer la forme tridimensionnelle de la protéine peuvent l'être tout autant. Cela peut conduire à l'altération de la protéine qui peut perdre de l'activité voire même devenir inactive. Les variations de pH peuvent non seulement affecter la forme de l'enzyme mais aussi le substrat en modifiant ses propriétés de charge, de sorte que ce dernier ne puisse plus ou moins bien se lier au site actif. Tout comme avec la température, chaque enzyme aura un pH où son activité sera maximale, ce qui correspondra finalement à l'état d'ionisation préférable pour

réaliser la catalyse. Les lipases présentent des propriétés catalytiques et un pH optimum variable. Par exemple, les lipases extracellulaires de *Cinnamomea antrodia* et de *Penicillium aurantiogriseum* ont un pH optimum de 8 (Lima *et al.*, 2004; Shu *et al.*, 2006), proche de celui de *Rhizopus oryzae* aux environs de 8.5 (Ben Salah *et al.*, 1994). D'autres lipases d'origine fongique ont généralement un pH optimum neutre ou légèrement acide: 7 pour la lipase de *Yarrowia lipolytica* (Destain *et al.*, 1997). Néanmoins, les lipases peuvent être actives sur une large gamme de pH, ainsi la lipase de *Yarrowia lipolytica* conserve au moins 60% de son activité avec un pH allant de 4 à 8.

Nous avons vu que l'environnement de l'enzyme, c'est-à-dire le solvant utilisé, l'activité thermodynamique de l'eau mais aussi le pH, avaient un effet déterminant sur son activité. Cependant, à côté de ces facteurs essentiels, bien d'autres paramètres peuvent directement influencer les cinétiques et les rendements des réactions biocatalysées par les lipases. La température, la nature et la concentration des substrats, la quantité d'enzymes et autres additifs, sont autant d'éléments qui peuvent améliorer et influencer sur l'activité enzymatique. C'est ce dont nous allons discuter à présent.

3.2.4 : La température

Il est trivial de dire, mais important de répéter, que l'augmentation de la température d'un système est le résultat de l'augmentation de son énergie cinétique. En d'autres termes, en augmentant la température d'un milieu réactionnel on augmente le mouvement des molécules ce qui favorise leur collision. Subséquemment, quand les molécules entrent en collision, leur énergie cinétique peut être convertie en une énergie potentielle chimique. Si l'énergie potentielle chimique des molécules devient assez grande, l'énergie d'activation d'une réaction peut être atteinte et une modification de l'état chimique se produira. De plus, plus l'énergie cinétique des molécules dans un système est grande, plus grande sera l'énergie potentielle chimique qui en résulte quand deux molécules entrent en

collision. Donc, plus la température d'un système est augmentée, plus il sera possible que des molécules par unité de temps atteignent l'énergie d'activation ce qui se traduira par une augmentation de la vitesse des réactions. Dans le cas des réactions enzymatiques, pour convertir un substrat en un produit, les enzymes doivent rentrer en collision avec ce dernier pour lui permettre de se lier au niveau de son site actif. L'augmentation de la température d'un système permettra d'augmenter le nombre de collisions enzyme-substrat par unité de temps favorisant la vitesse de la réaction.

Cependant, la stabilité d'une enzyme correspond au maintien de la structure tridimensionnelle de sa chaîne polypeptidique. Les liaisons de faible énergie de type liaison hydrogène, intervenant dans la conservation de la structure et dans la formation du complexe acyl-enzyme, sont favorisées à basse température, et peuvent se fragiliser lorsque la température augmente. En effet, compte tenu du fait que la température du système est augmentée, l'énergie interne des molécules dans le système croît également. L'énergie interne des molécules peut comprendre l'énergie de translation, de vibration et de rotation mais aussi l'énergie mise en jeu dans les liaisons chimiques inter et intramoléculaires. Une partie de cette chaleur peut être convertie en énergie potentielle chimique. Si cette augmentation de l'énergie chimique potentielle est assez grande, une partie des liaisons faibles qui déterminent la forme tridimensionnelle des protéines actives pourra être brisée. Cela pourrait conduire à une dénaturation thermique de la protéine et donc inactiver celle-ci. De ce fait, une augmentation trop importante de la température peut provoquer une diminution de l'efficacité de la catalyse enzymatique d'une réaction et diminuer la stabilité de l'enzyme.

Chaque lipase a un champ de température dans lequel une vitesse maximale de réaction est atteinte. Ce maximum correspond à la température optimale de l'enzyme, et il est différent selon le type, la source et la formulation enzymatique (libre ou immobilisée par exemple). De nombreuses lipases microbiennes ont une activité maximale située entre 30 et 40°C. Les lipases de *Y. lipolytica* et *Penicillium citrinum* par exemple, ont une activité maximale à 37°C (Pimentel *et al.*, 1994; Destain *et al.*, 1997). De plus, la lipase de *Penicillium citrinum* est très peu résistante à la

température. En effet, elle perd 50 % de son activité après 30 min à 60°C. Il existe cependant des enzymes actives à des températures plus élevées. Par exemple, *Penicillium wortmanii* (Costa e Peralta, 1999), *Pseudomonas sp* (Gaoa et al., 2000) ou encore *Penicillium aurantiogriseum* (Lima et al., 2004) produisent des lipases qui ont une activité maximale aux environs de 45°C tout en restant très actives à des températures allant jusqu'à 80°C. En outre, la formulation de l'enzyme permet bien souvent d'augmenter sa résistance thermique comme observé avec la lipase B de *Candida antarctica* qui une fois sous sa forme immobilisée (résine macroporeuse et vendue sous le nom de Novozym435) permet un maintien de son activité maximale aux alentours de 70°C. Pour cette dernière il est tout de même recommandé de la mettre en œuvre en dessous de 60°C afin de préserver son intégralité catalytique dans le temps.

3.2.5 : Nature des substrats

Comme expliqué auparavant, les réactions biocatalysées par les lipases impliquent la présence de deux substrats dans leur site actif. L'un ayant un centre électrophile tandis que l'autre a une action plutôt nucléophile. La nature de ces substrats impactera directement leur réactivité et l'activité de l'enzyme. En effet, dans le site actif étroit de la lipase, les substrats se positionnent de façon à former un motif en épingle à cheveux (intermédiaire tétraédrique cf. Figure 5). Il n'est donc pas surprenant que dans les différents états de transition lors de la catalyse, la nature des chaînes alkyle du donneur d'acyle et de l'alcool soit importante dans l'activité catalytique de l'enzyme. La spécificité de substrat sera fonction de la lipase utilisée et pourra varier selon son origine. Par ailleurs, la nature chimique du donneur d'acyle peut également fortement influencer l'efficacité de la réaction. Cette amélioration ne sera pas forcément due à une préférence de la spécificité du substrat par l'enzyme, mais davantage liée à des conditions thermodynamiques favorisées. Par exemple, l'utilisation de donneur d'acyle du type acide gras dans un processus d'estérification directe va générer la formation d'eau. L'eau libérée durant la réaction sera un

nouveau substrat nucléophile potentiel pour la lipase et pourra en ce sens participer à la réversibilité de la réaction. Dans ce cas, les réactions catalysées par les lipases conduisent à des équilibres thermodynamiques qui limitent parfois la formation du produit recherché. Toutefois, en modulant les conditions réactionnelles, cet équilibre peut être déplacé dans le sens favorable de la synthèse. L'une des possibilités consiste en l'élimination en continu de l'eau formée grâce à l'utilisation de tamis moléculaires ou en travaillant sous pression réduite. Le déplacement de l'équilibre dans le sens de l'estérification peut être aussi favorisé par un excès de l'un des deux substrats, en général l'alcool qui entre en compétition nucléophile avec l'eau. De manière alternative, d'autres donneurs d'acyle peuvent être employés, comme les esters méthyliques ou éthyliques. Dans ce cas, une réaction de transestérification a lieu. L'utilisation de tels esters est généralement plus avantageuse par rapport aux acides gras libres, puisque l'élimination des alcools formés est thermiquement plus aisée que l'élimination de l'eau. Cependant, la libération de l'alcool tel que le méthanol dans de telles réactions peut diminuer l'efficacité de la catalyse lipasique. En effet, la faible couche d'hydratation de la lipase nécessaire à sa bonne activité peut être perturbée par la libération du méthanol agissant comme agent de « déshydratation » pour l'enzyme. Enfin, des donneurs d'acyles du type vinyliques peuvent aussi être utilisés. D'un point de vue thermodynamique, cette réaction est particulière par le fait que le nucléophile (alcool vinylique) libéré pendant la réaction est spontanément transformé par tautomérie en acétaldéhyde qui ne peut plus dès lors agir sur la réversibilité de la réaction. En effet, l'acétaldéhyde est facilement retiré du milieu réactionnel en raison de son faible point d'ébullition. Par conséquent, cette réaction ne conduit quasiment pas à un équilibre réactionnel, celui-ci étant rapidement déplacé dans le sens favorable de la synthèse. Il a toutefois été montré que la formation de base de Schiff par l'addition de l'acétaldéhyde sur les groupes aminés libres (lysine, arginine) de l'enzyme, pouvait conduire malheureusement à sa dénaturation et à une perte significative d'activité (Bjorkling *et al.*, 1989). En conclusion, les réactions menées avec un ester vinylique comme donneur d'acyle conduisent bien souvent à une amélioration des cinétiques et des taux de conversion. Par exemple, la transestérification de l'octan-2-ol avec le vinyl octanoate catalysée par

la lipase B de *Candida antarctica* est deux fois plus rapide qu'avec l'éthyl octanoate (Niklas Öhrner *et al.*, 1994).

Enfin, il ne faut pas omettre de signaler que pour favoriser la cinétique réactionnelle, une augmentation de la quantité d'enzyme peut être envisagée. En admettant que les paramètres réactionnels ne varient pas au cours de la réaction et que la concentration en substrat est grande, la vitesse de réaction sera proportionnelle (jusqu'à atteindre un maximum correspondant à l'apparition de limitations diffusionnelles) à la quantité d'enzyme mise en jeu.

3.2.6 : Additifs et autres facteurs physiques

L'activité d'une lipase peut être améliorée grâce à l'emploi d'additifs et/ou en utilisant des facteurs physiques. L'un des premiers exemples d'ajout d'additifs comme agent d'amélioration de l'activité lipasique en milieu organique est l'emploi de sels qui vont permettre, entre autres, de maintenir la teneur en eau constante dans le milieu (Halling, 1992). La présence de cyclodextrines lors de l'étape de lyophilisation de la lipase de *Pseudomonas cepacia* améliore la flexibilité de l'enzyme et favorise sa résistance aux solvants et aux produits d'inhibition ce qui permet d'accroître significativement la vitesse et la sélectivité de la réaction (Ghanem, 2003). D'autres auteurs ont montré que les éthers couronne pouvaient avoir également un effet bénéfique sur l'activité catalytique de la lipase dans les solvants organiques en apportant une protection en milieu acide, en changeant la conformation du site actif ou bien encore en modifiant le réseau de liaisons hydrogène (Itoh *et al.*, 1996; Takagi *et al.*, 1996; Secundo *et al.*, 2007). De plus, l'ajout d'amines pourrait intervenir dans la neutralisation des acides formés lors des réactions parasites et préviendrait ainsi de la dénaturation des lipases (García-Urdiales *et al.*, 2001). Les tensio-actifs permettraient d'améliorer la solubilité des enzymes en milieu organique (Zeng e Yan, 2007; Thielmann *et al.*, 2009). Les gaz nobles tels que le néon, l'argon, le xénon ou encore le krypton en contact avec les lipases lors de la catalyse permettent d'augmenter leurs activités (Spencer, 1992). En complément, l'emploi de tamis

moléculaires permettant à la fois de piéger les molécules d'eau et d'éviter la formation de produits d'hydrolyses parasites peut aussi être ajouté dans la liste des additifs permettant d'influencer positivement la réaction.

Par ailleurs, les réactions catalysées par les lipases peuvent être aussi améliorées en utilisant des facteurs physiques. Parmi eux, l'utilisation d'ondes ultrasonores (sonochimie) peut permettre d'améliorer fortement la faisabilité d'une réaction. Le phénomène de cavitation sera presque exclusivement à l'origine de l'amélioration de la catalyse. Par exemple, (Lee *et al.*, 2008) ont pu améliorer l'activité enzymatique dans des liquides ioniques pour réaliser l'alcoololyse du glucose avec le laurate de vinyle ou l'acide laurique en utilisant une irradiation par ultrasons, sans avoir d'influence négative sur la stabilité de la lipase. L'amélioration du transfert de masse dans les milieux visqueux tel que les liquides ioniques peut expliquer l'augmentation de la cinétique. L'effet positif des ultrasons a été également observé en milieu fondu lors de l'hydrolyse de l'huile de soja avec une vitesse de réaction doublée par rapport à une agitation mécanique et sans dégradation supplémentaire de l'enzyme. Les auteurs ont statué sur le fait que l'amélioration pouvait être attribuée à une meilleure dispersion de l'enzyme. De plus, des études ont montré que la cinétique d'acylation par la lipase pancréatique de porc pouvait être multipliée jusqu'à 83 fois sous l'action d'ondes ultrasonores (Lin e Liu, 1995). Enfin citons les travaux de Fiametti *et al.* (Fiametti *et al.*, 2011) sur l'effet synergique ultrason plus tensio-actif pour la production de mono et diacylglycérol lors des réactions de glycérolyse en milieu fondu catalysées par la lipase B immobilisée de *Candida antarctica* (Novozym435). Les rendements et vitesses de formation de diacylglycérol peuvent être aussi améliorés en utilisant des ultrasons lors de l'hydrolyse partielle de triacylglycérol en utilisant différentes lipases immobilisées (Babic *et al.*, 2010). Pour conclure, des travaux ont démontré qu'il était possible d'améliorer significativement les cinétiques réactionnelles d'acylation par la lipase pancréatique de porc en utilisant une irradiation à l'aide de microondes (Lin e Lin, 1998).

Cette section aura permis d'avoir bien présent à l'esprit que l'efficacité réelle de la réaction enzymatique est multifactorielle. Ainsi, les conditions expérimentales telles

que le choix du solvant et du substrat, la température, le pH, l'activité thermodynamique de l'eau, la quantité d'enzyme ainsi que la nature du bio-réacteur (batch, lit catalytique, ...) sont primordiales avec une influence directe sur les rendements et vitesses de réaction.

3.3 : Réaction de lipophilisation biocatalysée par les lipases

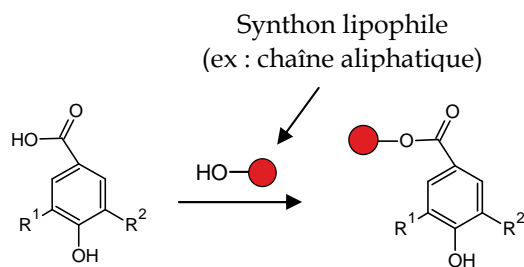
3.3.1 : L'enjeu des réactions dites de lipophilisation

La réaction de lipophilisation consiste à greffer de façon covalente, par biocatalyse ou par voie chimique, un synthon lipophile sur des fonctions réactives d'une molécule d'intérêt. Ces modifications visent principalement à abaisser la polarité de la dite molécule. De nombreux exemples peuvent être trouvés dans la Littérature dans lesquels la molécule d'intérêt est lipophilisée. Celle-ci peut être un sucre, un acide aminé, une protéine, une vitamine hydrosoluble ou bien encore un polyphénol. Parmi ces derniers, les acides phénoliques représentent un groupe important et diversifié de métabolites secondaires qui sont naturellement très répandus dans le règne végétal et d'un intérêt particulier. En effet, ces produits sont connus pour leur rôle protecteur potentiel contre les dommages oxydatifs et leur action comme antioxydants naturels dans divers produits alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques est avérée (Soobrattee *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2010; Vanden Berghe, 2012). Cependant, la plupart des acides phénoliques expriment leurs propriétés fonctionnelles dans un environnement hydrophile. Pour cette raison, très peu d'applications ont été développées dans des préparations à base d'huile. Ainsi, une approche pratique pour mettre en œuvre les acides phénoliques dans une formulation lipophile est d'augmenter leur caractère hydrophobe. En ce sens, les réactions de lipophilisation sont particulièrement intéressantes et efficaces. La principale méthode consiste à greffer une chaîne aliphatique sur le groupement carboxylique fonctionnel de l'acide phénolique, permettant la création d'une

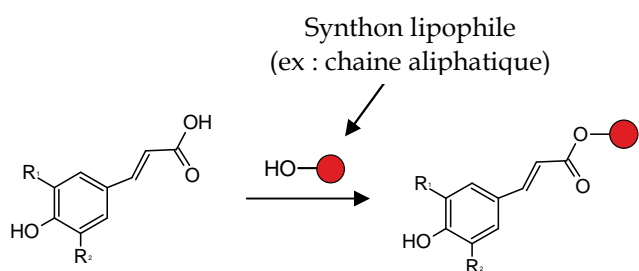
nouvelle molécule ayant des propriétés émulsifiantes et une activité antioxydante pouvant être fortement améliorée (Laguerre *et al.*, 2010).

Dans le cas des acides phénoliques, la méthode couramment employée consiste à greffer sur son groupement carboxylique réactif, un alcool ayant une longueur de chaîne aliphatique plus ou moins longue. Cette réaction peut être effectuée sur des acides phénoliques simples dérivés des acides benzoïques (acides hydroxybenzoïques) ou cinnamiques (acides hydroxycinnamiques), ou sur des acides polyphénoliques plus complexes tels que les acides chlorogénique et rosmarinique (Figure 10).

	R ¹	R ²
Acide protocatéchique	OH	H
Acide gallique	OH	OH
Acide 4-hydroxybenzoïque	H	H



	R ¹	R ²
Acide <i>p</i> -coumarique	H	H
Acide sinapique	OCH ₃	OCH ₃
Acide férulique	OCH ₃	H
Acide caféique	OH	H



	R ¹
Acide hydrocaféique	OH
Acide 4-hydroxyphénylpropionique	H

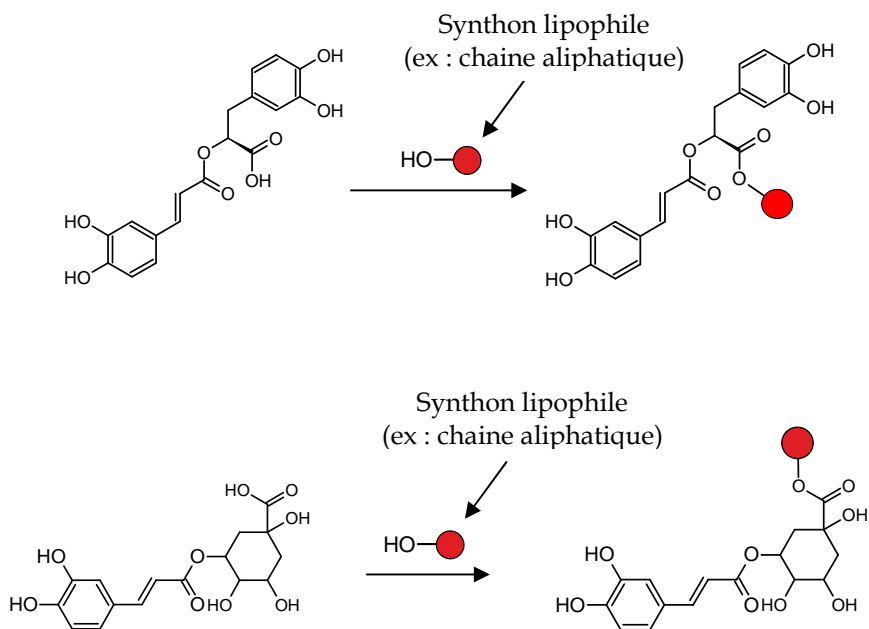
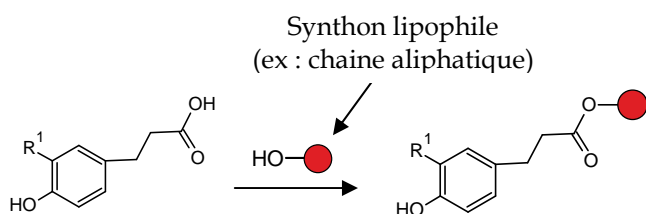


Figure 10 : Exemples de lipophilisations d'acides (poly)phénoliques.

3.3.2 : Lipophilisation de composés phénoliques biocatalysées par des lipases

La lipophilisation des antioxydants phénoliques peut être effectuée par voie chimique ou enzymatique. Les stratégies d'hydrophobation chimique sont très peu employées pour la lipophilisation de dérivés phénoliques car l'instabilité aux températures élevées et aux milieux alcalins de ces molécules est un problème. De plus, la voie enzymatique présente de nombreux avantages : des conditions réactionnelles plus douces, la réduction de la formation de sous-produits, des étapes de purification moindre, et permet aussi de mettre en place des procédés plus écologiques. Cependant, une des difficultés rencontrées dans cette réaction biocatalysée est l'optimisation de la synthèse (en termes de rendement et de cinétique) avec deux substrats de polarités différentes. Par conséquent, il est primordial de sélectionner un milieu réactionnel dans lequel les deux substrats, différents en terme de polarités seront solubles, du moins partiellement, et où l'activité de l'enzyme pourra être maintenue à un niveau satisfaisant. En effet, dans les solvants non polaires comme l'hexane où les lipases maintiennent généralement une bonne activité, les composés phénoliques beaucoup plus polaires ont une très faible solubilité. En revanche, dans les milieux polaires organiques les composés phénoliques auront une bonne solubilité, mais les lipases présenteront bien souvent une activité limitée. Néanmoins, il existe plusieurs rapports traitant de l'estérification efficace des acides phénoliques avec des alcools gras en solvant organique, en mélange fondu ou bien encore en utilisant des liquides ioniques (Tableau 12).

Acides phénoliques	Substrats	Conditions de réaction	Références
Chlorogénique	Butanol, Octanol, Dodecanol, Hexadecanol	S=Mélange fondu (10 ml d'alcool gras), T=55°C, E=Novozym435	(Lopez-Giraldo <i>et al.</i> , 2007)
Dihydrocaféique	Octanol	S=Octanol/tOMA.TFA, RM (alcool/acide = 38), T=70°C, E= <i>C.antarctica</i> B	(Yang <i>et al.</i> , 2012)
Cinnamique, Dihydrocaféique, 3,4-Dihydroxyphenyl acétique, 3,4-Dimethoxy benzoïque, Férulique, Sinapique	Huile de lin	RM (acide/huile = 1), S=85(hexane)/15(2-butanone), T=55°C, E=Novozym435	(Karboune <i>et al.</i> , 2008)
3,4-Dihydroxyphényl acétique	Huile de Krill	S=7% 2-butanone dans 2ml huile, T=60°C, E=Novozym435	(Aziz <i>et al.</i> , 2012)
Dihydrocaféique, férulique, caféique	Butanol, Hexanol, Octanol, Decanol, Dodecanol	RM (acide/alcool=3), S=Hexane/2-butanone, T=60°C, E=Novozym435	(Zhiyong <i>et al.</i> , 2012)
Cinnamique et ses dérivés	Méthanol, Ethanol, Propanol, Butanol, Hexanol, Octanol, Geraniol	S=Liquides ioniques, T=60°C, E=Novozym435, RMIM, TLIM, Lipolase 100T.	(Katsoura <i>et al.</i> , 2009)
Dérivés (Hydroxy)cinnamates de méthyle ou d'éthyle	Alcool oléique	S=Mélange fondu, T=80°C, E=Novozym435, RMIM, TLIM	(Weitkamp <i>et al.</i> , 2006)

Acides phénoliques	Substrats	Conditions de réaction	Références
Cinnamique, Dihydrocaféique, 3,4- Dimethoxycinnamique, Férulique.	Butanol, Octanol, Dodecanol, alcool oléique	S=Mélange fondu, T=60°C, E=Novozym435	(Guyot <i>et al.</i> , 1997)
isomères Hydroxycinnamique	Octanol	S=Mélange fondu, T=60°C, E=Novozym435	
Cinnamique, Dihydrocaféique, 3,4- Dimethoxycinnamique, Férulique, Caféique	Butanol	S=Mélange fondu, T=60°C, E=Novozym435	
Cinnamique, <i>p</i> - coumarique, Férulique, <i>p</i> -Hydroxyphenyl propionic	Octanol	S=Mélange fondu (5 ml d'alcool gras), T=45°C, E=Novozym435, LRM, LCR	(Stamatis <i>et al.</i> , 2001)
Quinate de méthyle	Octanol, Dodecanol, Hexadecanol	RM (alcool/ester=6), S=2-méthyl-2-butanol, T=60°C, E=Novozym435	(Villeneuve <i>et al.</i> , 2002)
Cinnamique	Butanol	RM (alcool/acide=1), S=éther diéthylique ou méthyl tert-butyl éther ou butanol ou cyclohexane ou pentane, T=34°C, E= <i>C. antarctica</i> B	(Buisman <i>et al.</i> , 1998)
Dihydrocaféique, Férulique	Trilinéoléine, Trilinéolénine	S=75(hexane)/25(2- butanone), T=55°C, E=Novozym435	(Sabally <i>et al.</i> , 2006)
Caféate de méthyle ou d'éthyle	Propanol	S=Liquides ioniques, T=60°C, E=Novozym435	(Pang <i>et al.</i> , 2013)
Férulate d'éthyle	Glycérol	S=Liquides ioniques, E=Novozym435	(Sun <i>et al.</i> , 2013)

Tableau 12 : Lipophilisation enzymatique (lipase) d'acides phénoliques. S=solvant, T=température, RM=ratio molaire et E=enzyme.

Selon ces études, les réactions catalysées par les lipases dans des solvants organiques sont toujours préférables à celles utilisant un système en milieu fondu, car elles permettent entre autres une bien meilleure solubilité des composés phénoliques. Par ailleurs, les mélanges binaires de solvants organiques semblent être la meilleure solution pour réaliser ce type de réaction. En effet, la mise au point d'un tel système réactionnel permet de finement adapter la solubilité des substrats (en particulier les composés phénoliques) tout en maintenant un bon niveau d'activité de la lipase. Malgré tout, ces réactions enzymatiques sont souvent limitées en termes de rendement avec bien souvent des temps de réaction extrêmement longs. De plus, l'utilisation d'une quantité importante de biocatalyseur et des ratios molaires en alcool très élevés sont souvent observés. Ce dernier point peut générer des difficultés importantes quand il s'agit de la séparation et de la purification des produits.

En définitive, ce rapport bibliographique nous aura permis de constater l'importance et la légitimité de développer d'autres milieux réactionnels plus performants et moins coûteux pour la lipophilisation enzymatique de molécules d'intérêt (en particulier celles des composées phénoliques), en mettant l'accent sur des voies réactionnelles respectueuses de l'environnement.

CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES

1 : MATERIELS

Tous les solvants utilisés sont de qualité analytique (hormis le méthanol et l'acétonitrile pour lesquels les qualités sont du type HPLC). Les produits mis en œuvre dans les synthèses sont de pureté supérieure ou égale à 98% (Tableau 13).

1.1 : Solvants et réactifs

Solvant	Fournisseur	Référence
Acétate d'éthyle	Labover	319902
Acétone	Labover	400974
Acétonitrile	Labover	34967
Acide acétique	Labover	20104298
Acide chlorhydrique 37%	Labover	403872
Acide formique	Labover	06450
Chloroforme	Labover	438603
Dichlorométhane	Labover	412662
Eau	Sigma-Aldrich	34877
Ether diéthylique	Labover	309966
Hexane	Labover	52765
Isopropanol	Labover	412421
Méthanol	Labover	525102
Tétrahydrofurane	Labover	401757
Toluène	Labover	412642

Réactifs	Fournisseurs	Références
Acétamide	Sigma-Aldrich	00160
Acide itaconique	Sigma-Aldrich	I29204
Acide lévulinique	Sigma-Aldrich	W262706
Acide malonique	Sigma-Aldrich	M-1750
Acide oxalique	Sigma-Aldrich	241172
Acide phénylacétique	Sigma-Aldrich	P16621
Acide phénylpropionique	Sigma-Aldrich	W288918
Amberlite IR120H	Sigma-Aldrich	216534
Carbonate de sodium	Sigma-Aldrich	451614
Chlorure d'éthylammonium	Sigma-Aldrich	232831
Chlorure de cholinium	Sigma-Aldrich	C1879
Ethylène glycol	Sigma-Aldrich	29323-7
Glycérol	Sigma-Aldrich	G7893
N-méthylurée	Sigma-Aldrich	M86804
Pentoxyde de phosphore	Fluka	79609
Silica gel 60Å, 63-200µm	Sigma-Aldrich	391484
Sulfate de sodium anhydre	Sigma-Aldrich	71961
Tamis moléculaire 4Å	Sigma-Aldrich	69834
Urée	Fluka	51458
D-sorbitol	Sigma-Aldrich	S1876

Tableau 13 : Référence des solvants et réactifs chimiques fournis par Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France).

1.2 : Substrats mis en œuvre

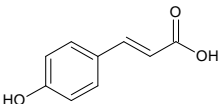
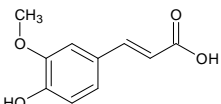
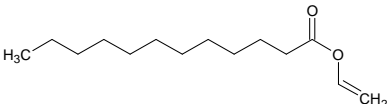
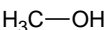
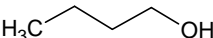
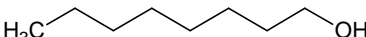
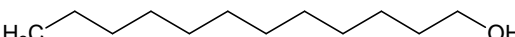
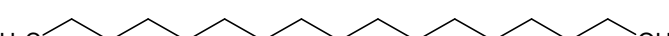
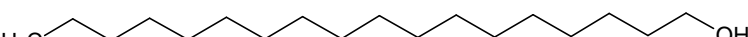
Substrats donneurs d'acyle		
<p>Acide <i>p</i>-coumarique</p> <p>MM : 164.15 g.mol⁻¹</p>  <p>Fournisseur : Sigma-aldrich ref : C9008</p>	<p>Acide ferulique</p> <p>MM : 194.18 g.mol⁻¹</p>  <p>Fournisseur : Sigma-aldrich ref : 128708</p>	<p>Laurate de vinyle</p> <p>MM : 226.36 g.mol⁻¹</p>  <p>Fournisseur : Sigma-aldrich ref : 61725</p>
Substrats nucléophiles : alcools aliphatiques		
Nom, Masse molaire Fournisseur, Référence	Structure	
Méthanol (MM : 32.04 g.mol ⁻¹) Labover, ref : 525102		
Butan-1-ol (MM : 74.12 g.mol ⁻¹) Sigma-aldrich, ref : 281549		
Octan-1-ol (MM : 130.22 g.mol ⁻¹) Sigma-aldrich, ref : 297887		
Dodécan-1-ol (MM : 186.33 g.mol ⁻¹) Sigma-aldrich, ref : 443816		
Hexadécan-1-ol (MM : 242.44 g.mol ⁻¹) Sigma-aldrich, ref : 258741		
Octadécan-1-ol (MM : 270.49 g.mol ⁻¹) Sigma-aldrich, ref : 74720		

Tableau 14 : Référence et structure des substrats fournis par Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France).

1.3 : Biocatalyseurs

Lipase	Fournisseur	Référence
Immobilisées (granulométrie)		
Lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (0.15-0.3mm).	Sigma-Aldrich	90678
Lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i> (0.15-0.3mm).	Sigma-Aldrich	54327
Lipase de <i>Candida rugosa</i> (0.15-0.3mm).	Sigma-Aldrich	80841
Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (0.15-0.3mm).	Sigma-Aldrich	76564
Lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> (0.15-0.3mm).	Sigma-Aldrich	89445
Lipase B de <i>Candida antarctica</i> , Novozym435 (0.3-0.9mm).	Sigma-Aldrich	L4777
Lipase de <i>Mucor miehei</i> , RMIM (0.2-0.6mm).	Sigma-Aldrich	62350
Non-immobilisées		
Amano lipase M, de <i>Mucor Javanicus</i>	Sigma-Aldrich	534803
Amano lipase PS, de <i>Burkholderia Cepacia</i>	Sigma-Aldrich	534641
Amano lipase A, de <i>Aspergillus niger</i>	Sigma-Aldrich	534781
Lipase B de <i>Candida antarctica</i>	Sigma-Aldrich	62288

Tableau 15 : Référence des lipases fournis par Sigma Aldrich (St Quantin Fallavier, France).

La lipase B de *Candida antarctica* immobilisée (iCALB) : La lipase B de *Candida antarctica* utilisée dans cette étude est une préparation industrielle produite par la société Novo et commercialisée par Sigma-Aldrich. Elle est fournie avec une activité de 5000 U/g qui est définie comme étant la quantité d'enzyme qui permet la libération de 1 μ mol d'acide butyrique à partir de la tributyrine par minute à pH 7,5

et 40°C en condition équimolaire. Il s'agit d'une lipase immobilisée sur une résine acrylique macroporeuse qui se présente sous la forme de billes blanches de diamètre compris entre 0.3 et 0.9mm avec une teneur protéique enzymatique d'environ 10% (p/p).

2 : METHODES

2.1 : Synthèse des solvants de type MEP (Mélange Eutectique Profond)

Tous les donneurs de liaisons hydrogène utilisés pour la synthèse des MEP ont été séchés sous vide, en présence de gel de silice et de pentoxyde de phosphore (P_2O_5). Les sels d'ammonium ont été séchés, sous vide à 60 ° C, en présence de gel de silice pendant trois jours.

2.1.1 Synthèse des mélanges eutectiques binaires:

En fonction du ratio molaire entre le sel d'ammonium et le donneur de liaison hydrogène (qui est de 1:1 ou 1:2 dans les MEP sélectionnés) les mélanges sont préparés en pesant chaque composé directement dans un ballon (Tableau 16) et en évitant tout contact du mélange avec l'humidité de l'air. Les mélanges eutectiques proprement-dits sont ensuite obtenus par agitation et chauffage dans un incubateur de type IKA KS 400i à contrôle orbital et à 250 rpm jusqu'à la formation d'un liquide homogène incolore (généralement deux heures à 65°C).

Pour 10g de sel d'ammonium (N ⁺)	Donneur de liaison hydrogène (DLH)	MM (g.mol ⁻¹) du DLH	Ratio molaire à l'eutectique (N ⁺ :DLH)	Masse à peser (g) du DLH
ChCl	Urée	60,05	1:2	8,60
ChCl	Glycérol	92,1	1:2	13,19
ChCl	N-méthylurée	74,1	1:2	10,61
ChCl	Acétamide	59,1	1:2	8,47
ChCl	Acide phénylacétique	136,15	1:1	9,75
ChCl	Acide phénylpropionique	150,17	1:1	10,75
ChCl	Acide lévulinique	116,11	1:2	16,63
ChCl	Acide itaconique	130,1	1:1	9,32
ChCl	Sorbitol	182,1	1:1	13,04
ChCl	Acide malonique	104,06	1:1	5,88
ChCl	Acide oxalique	90,03	1:1	6,38
ChCl	Ethylène glycol	62,07	1:2	6,52
EAC	Urée	60,05	1:2	14,73
EAC	Glycérol	92,1	1:2	22,59

Tableau 16 : Préparation des MEP.

2.1.2 Synthèse des mélanges ternaires ChCl :Eau :Urée:

Le chlorure de cholinium et l'urée sont directement pesés dans un flacon, en évitant tout contact avec l'humidité de l'air, puis, le mélange est chauffé (65°C) et agité (250rpm, contrôle orbital) jusqu'à ce qu'un liquide homogène incolore soit formé. L'eau est alors ajoutée et le mélange est chauffé et agité dans les mêmes conditions que précédemment pendant au moins 15 min avant utilisation. La composition des mélanges ternaires testés lors de cette étude est donnée dans le Tableau 17 ci-dessous.

Masse du mélange (mg)	Masse ChCl (mg)	Masse Urée (mg)	Masse eau (mg)	n ChCl (mmol)	n urée (mmol)	n eau (mmol)	%massique en eau
179	139,6	30,0	9	1	0,5	0,5	5,0
209	139,6	60,0	9	1	1	0,5	4,3
269	139,6	120,1	9	1	2	0,5	3,4
329	139,6	180,2	9	1	3	0,5	2,7
188	139,6	30,0	18	1	0,5	1	9,6
218	139,6	60,1	18	1	1	1	8,3
278	139,6	120,1	18	1	2	1	6,5
338	139,6	180,2	18	1	3	1	5,3
197	139,6	30,0	27	1	0,5	1,5	13,7
227	139,6	60,0	27	1	1	1,5	11,9
287	139,6	120,1	27	1	2	1,5	9,4
347	139,6	180,2	27	1	3	1,5	7,8
206	139,6	30,0	36	1	0,5	2	17,5
236	139,6	60,0	36	1	1	2	15,3
296	139,6	120,1	36	1	2	2	12,2
356	139,6	180,2	36	1	3	2	10,1
224	139,6	30,0	54	1	0,5	3	24,1
254	139,6	60,0	54	1	1	3	21,3
314	139,6	120,1	54	1	2	3	17,2
374	139,6	180,2	54	1	3	3	14,5
242	139,6	30,0	72	1	0,5	4	29,8
272	139,6	60,0	72	1	1	4	26,5
332	139,6	120,1	72	1	2	4	21,7
392	139,6	180,2	72	1	3	4	18,4

Tableau 17 : Préparation des mélanges ternaires.

2.2 : Broyage du biocatalyseur Novozym435 (iCALB)

Le biocatalyseur Novozym435 (lipase B de *Candida antarctica* immobilisée, iCALB) est broyé à l'aide d'un broyeur à bille de type RETSCH MM200 pendant 5 minutes à la fréquence de 750 tr.min⁻¹. Après tamisage, la fraction granulométrique comprise entre 100µm et 165µm est sélectionnée pour les essais de biocatalyse.

2.3 : Détermination de la teneur en eau

Les mélanges eutectiques synthétisés sont équilibrés à différentes activités thermodynamique de l'eau (a_w) dans un récipient fermé pendant 26 jours à 25 ° C en utilisant les solutions saturées des sels suivants : LiCl ($a_w = 0,11$), CH₃CO₂K ($a_w = 0,22$), K₂CO₃ ($a_w = 0,44$), NaCl ($a_w = 0,75$). La quantité d'eau absorbée par chaque mélange eutectique est ensuite mesurée à 20°C par la méthode de Karl Fischer de type GRS 2000 (Bioblock scientifique, Villebon Courtaboeuf, France), en utilisant une solution d'Hydranal ® Coulomat AG comme analyte.

2.4 : Détermination du pH

Le pH est mesuré à l'aide d'un appareil de type Titrino GP 736 (Metrohm, Villebon Courtaboeuf, France) en utilisant le logiciel TIAMO 1.2 pour l'analyse des données. Les mesures sont réalisées à 60°C (température rapportée du pH stat = 58,6°C) sur un échantillon de 10 ml de solvant fraîchement préparé. L'eau est ajoutée progressivement par des ajouts de volume contrôlés, et le pH est enregistré après stabilisation.

2.5 : Détermination de l'activité thermodynamique de l'eau (a_w)

Les échantillons fraîchement préparés et chauffés à 60°C dans des flacons hermétiques sont refroidis à température ambiante, et l' a_w est déterminée à 23,3 ° C

en utilisant un appareil de la marque Aqualab CX-2 série 3 (Pullman, Washington, USA).

2.6 : Synthèse et purification des esters méthyliques des acides phénoliques

L'estérification chimique de l'acide phénolique (6,58 mmol) est réalisée dans des flacons scellés contenant 75 ml de méthanol. Le mélange réactionnel est agité à 60°C en utilisant un incubateur muni d'une agitation orbitale (250 rpm) jusqu'à dissolution parfaite des substrats. Puis, 3,015 g de résine sulfonique Amberlite IR-120H (5% du poids total des deux substrats), préalablement séchée à 110 ° C pendant 48 heures, sont ajoutés. L'eau produite lors de la réaction est éliminée par adsorption sur tamis moléculaire 4Å (3 g). Des échantillons (20 µl) sont régulièrement prélevés dans le milieu réactionnel et analysés par chromatographie sur couche mince. Après 5 jours, le mélange réactionnel est filtré et l'alcool évaporé sous vide. Le résidu est solubilisé dans l'acétate d'éthyle (30 ml) et lavé successivement avec une solution aqueuse saturée de carbonate de sodium (2 x 20 ml) et de l'eau ultra pure (2 x 20 ml). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre, puis filtrée et évaporée à sec sous vide. Le produit brut est alors purifié par chromatographie Flash en utilisant un système de type Companion CombiFlash (Teledyne Isco Inc., Lincoln, NE, USA). Le gradient d'élution utilisé est un mélange (v/v) d'hexane et d'acétate d'éthyle (90/10 à 0/100 en 45 min). L'élution du produit est suivie par UV à 254 nm. Les fractions correspondant au produit sont collectées dans un ballon et le solvant évaporé sous vide. Le méthyl *p*-coumarate et le méthyl férulate sont obtenus sous la forme d'une poudre blanche (> 99% HPLC) après séchage sous vide pendant 2 jours à 50°C.

2.7 : Conditions générales de transestérification

2.7.1 Avec le laurate de vinyle comme substrat donneur d'acyle

Les réactions de transestérification du laurate de vinyle par des alcools de différentes longueurs de chaîne sont effectuées à 40, 50 ou 60 °C dans des flacons hermétiques contenant 1 ml de MEP et 1 mg d'iCALB broyée et dont l'activité de l'eau (a_w) a été préalablement fixée à 0,44. Après 30 min d'incubation, 40 μ mol (9.05 mg) de laurate de vinyle et 240 μ mol d'alcool (butanol 17.8mg, octanol 31.25mg, octadécanol 64.8mg) sont ajoutées et le mélange est agité sous agitation magnétique. La réaction est stoppée en ajoutant 1 ml de solution HCl (1M) et tous les produits de la réaction sont extraits à l'hexane (4 ml) et analysés par spectrophotométrie UV et chromatographie en phase gazeuse. Tous les produits issus de la réaction sont identifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en mode impact électronique. L'activité spécifique du catalyseur est déterminée au cours des 5 premières minutes de la réaction. Chaque test (correspondant à un alcool) est répété trois fois. Parallèlement, des réactions témoin, sans alcool, sont réalisées pendant 16 heures, en vue de déterminer la réactivité des composants du mélange eutectique.

2.7.2 Avec les composés phénoliques comme substrats donneurs d'acyle

Les essais sont effectués à 60°C sous atmosphère d'azote, dans des flacons de 30 ml hermétiquement fermés contenant 5 ml de MEP et de l'eau à une teneur massique variant de 0 à 20% (p/p). Au mélange obtenu sont ajoutés, 200 μ mol de l'ester méthylique (35,6 mg de *p*-coumarate de méthyle ou 41,6 mg de férulate de méthyle) et 1200 μ mol d'octanol (190,35 μ l), soit un ratio molaire ester phénolique/octanol de 1:6. Après dissolution complète des substrats, la réaction initiée par l'addition de 50 mg d'enzyme immobilisée (ou 10 mg d'enzyme « libre »), et poursuivie sous agitation orbitale à 200 rpm à l'aide d'un agitateur orbitale de type STUART scientifique S150.

Concernant les réactions en mélange ternaire (ChCl:eau:urée), les essais sont réalisés dans 5 ml de mélange fraîchement préparé (§ 2.1.2) contenant 200 μ mol de l'ester méthylique (35,6 mg de *p*-coumarate de méthyle ou 41,6 mg de férulate de méthyle) et 600, 1200 ou 2400 μ mol de 1-alcanol dans un ratio molaire respectivement 1:3, 1:6 et 1:12. Après dissolution complète des substrats, la réaction est initiée après addition de 50 mg de iCALB puis agitée à 250 rpm à l'aide d'un agitateur orbitalaire de type IKA KS 400i.

Quel que soit le type de mélange, binaire ou ternaire, les cinétiques réactionnelles sont suivies par HPLC sur des échantillons dilués dans un mélange (1/2, v/v) de méthanol et d'acétonitrile puis filtrés à 0,45 μ m.

2.8 : Mesure de l'activité résiduelle de l'enzyme

2.8.1 Avec le laurate de vinyle comme substrat donneur d'acyle

1 mg d'enzyme (iCALB broyée) est pré-incubé dans le MEP (1 ml) sous agitation orbitaire à 50°C dans un flacon hermétiquement fermé. Après un temps d'incubation donné, sont ajoutés 40 μ mol de laurate de vinyle et 240 μ mol de l'alcool correspondant. La réaction a été maintenue à 50°C et l'activité spécifique est comparée à celle d'un mélange sans pré-incubation de la lipase. L'avancement de la réaction est déterminé par spectrophotométrie UV à 195 nm et par chromatographie en phase gazeuse selon la méthode décrite précédemment.

2.8.2 Avec les composés phénoliques comme substrats donneurs d'acyle

Dans 5 ml du mélange (MEP-eau) approprié, 50 mg de iCALB sont pré-incubés sous agitation orbitalaire à 60°C dans un flacon hermétiquement fermé et sous atmosphère d'azote. Après un temps donné, 200 μ mol (35,65 mg) de *p*-coumarate de méthyle et 1200 μ mol (190,35 μ l) de 1-octanol sont ajoutées au milieu réactionnel. La réaction est

maintenue à 60°C, et l'activité spécifique est comparée à celle obtenue sans pré-incubation de la lipase. L'activité résiduelle, exprimée en pourcentage, est définie comme étant $(100 \times \text{activité spécifique après incubation}) / (\text{activité spécifique sans pré-incubation})$.

2.9 : Techniques analytiques

2.9.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

L'avancement de la réaction de formation des esters méthyliques de l'acide férulique et de l'acide *p*-coumarique est déterminé par chromatographie sur couche mince (CCM). La phase éluante utilisée est un mélange de chloroforme-méthanol dans un ratio volumique 93:7. Les plaques CCM utilisées sont de type silicagel 60F254. L'avancement de la réaction est déterminé par la visualisation des composés sous lumière UV à 366 nm. La réaction est stoppée après conversion totale de l'acide phénolique, soit environ 5 jours.

2.9.2 Chromatographie en phase gazeuse

La sélectivité de la réaction de transestérification du laurate de vinyle par les alcools a été évaluée par chromatographie en phase gazeuse (Agilent série 6890, Agilent Technologies, USA) en utilisant une colonne capillaire (Supelcowax: 30m de longueur, 0,32 mm de diamètre interne, épaisseur du film 0.25µm) et un détecteur à ionisation de flamme (270°C), avec l'hélium comme gaz vecteur (2ml.min⁻¹). 1 µl du mélange réactionnel (extrait avec de l'hexane dans le cas des réactions en MEP) est injecté à l'aide d'un injecteur diviseur (250°C) en mode split 1/100. Le programme de température du four est de 150°C à 235°C à 5°C.min⁻¹, puis 15 minutes à 235°C. Dans ces conditions, les temps de rétention sont les suivants (Tableau 18):

Molécule	Temps de rétention
1-butanol	0,8 min
1-octanol	1,17 min
1-octadécanol	9,61 min
Laurate de vinyle	2,04 min
Laurate de butyle	3,19 min
Laurate d'octyle	7,40 min
Laurate d'octadécyle	22,4 min

Tableau 18 : Temps de rétention en CPG des substrats et produits de la réaction de transestérification du laurate de vinyle.

2.9.3 Chromatographie en phase liquide

La sélectivité de la réaction d'alcoololyse du substrat phénolique par les alcools est évaluée par chromatographie en phase liquide (HPLC ThermoScientific P4000, AS3000) en utilisant une colonne HILIC NUCLEODUR (Macherey-Nagel: longueur 250 mm, diamètre interne 4,6 mm, taille des particules 5 μ m) reliée à un détecteur UV. Trois longueurs d'onde différentes (200, 245 et 335 nm) sont utilisées pour évaluer et quantifier les résultats. La séparation est effectuée sur un échantillon de 20 μ l à 28°C à 0,8 ml.min⁻¹ en utilisant une élution binaire comme phase mobile entre le solvant A: acétonitrile et le solvant B: solution aqueuse d'acide formique à 0,05% (v/v). La séparation est réalisée à l'aide du gradient d'élution suivant (Tableau 19) :

Temps (min)	0	15	18	32	35	40
Acétonitrile (v)	97	97	80	80	97	97
HCOOHaq 0,05% (v)	3	3	20	20	3	3

Tableau 19 : Gradient d'élution en HPLC pour la séparation et l'analyse des réactions.

Avec cette méthode d'élution, les temps de rétention sont (Tableau 20):

Molécule	Temps de rétention
<i>p</i> -coumarate de méthyle	4,4 min
Férulate de méthyle	4,4 min
<i>p</i> -coumarate de butyle	4,2 min
férulate de butyle	4,2 min
<i>p</i> -coumarate d'octyle	4,0 min
férulate d'octyle	4,0 min
<i>p</i> -coumarate de dodécyle	3,9 min
férulate de dodécyle	3,9 min
<i>p</i> -coumarate d'hexadécyle	3,7 min
férulate d'hexadécyle	3,7 min
Glycérol	10,8 min
Urée	14,8 min
chlorure de cholinium	28,4 min

Tableau 20 : Temps de rétention en HPLC des substrats et produits de la réaction de transestérification d'ester d'acides phénoliques.

2.9.4 Spectroscopie UV

Grâce à la forte capacité d'absorption du groupement vinylique présent sur le substrat (le laurate de vinyle), il est possible d'estimer sa conversion par de simple mesure de la perte d'absorption à 195 nm. Cette méthode permet un dosage facile et rapide de la cinétique réactionnelle. Pour cela, un aliquote de 20 µl du milieu réactionnel est ajouté à 1,98 ml d'hexane et l'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre du type PerkinElmer Lambda 25 UV/Visible dans une cuve en quartz thermostatée à 25°C et sous agitation magnétique.

2.9.5 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC-MS) :

L'identification des produits a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC/EI-MS). L'ionisation électronique des molécules a été effectuée en utilisant un appareil du type MS Thermo Scientific GC/DSQII associé au logiciel Xcalibur pour l'analyse des spectres et la fragmentation des molécules.

2.9.6 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) :

Les mesures infrarouges sont réalisées à 25°C en utilisant un spectromètre IR à transformée de Fourier de type tensor 27 de la marque Bruker. Ce dernier est équipé d'un diamant ATR de réflexion de type GladiATR™ avec un détecteur DLaTGS et une source laser de type MIR. Les spectres sont mesurés avec une résolution de 4 cm⁻¹ avec une longueur d'onde allant de 400 à 4000 cm⁻¹. Le logiciel OPUS de Bruker Optik GmbH Ettlinger (Allemagne) a été utilisé pour l'analyse des spectres et l'intégration des bandes de vibration.

2.10 : Définition des calculs

Le taux de de conversion (%) du substrat donneur d'acyle est calculé comme suit :

$$\text{Conversion (\%)} = 100 \frac{\text{moles de substrat consommées}}{\text{moles de substrat à } t = 0}$$

Le rendement d'hydrolyse (%) du substrat donneur d'acyle est défini par la formule :

$$\text{Hydrolyse (\%)} = 100 \frac{\text{moles d'acide formées}}{\text{moles de substrat consommées}}$$

Le rendement (%) en dérivé lipophilisé souhaité obtenu à partir du substrat donneur d'acyle est défini par la formule :

$$\text{Rendement (\%)} = 100 \frac{\text{moles d'ester formées}}{\text{moles de substrat consommées}}$$

Enfin, le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) de l'enzyme est calculé d'après l'équation:

$$A(t) = A(t_0) \cdot e^{-kt}$$

Où :

$A(t)$, représente l'activité de l'enzyme après un temps t d'incubation.

$A(0)$, représente l'activité de l'enzyme à $t=0$, c'est-à-dire sans temps d'incubation.

k , représente la constante de désactivation du biocatalyseur. Elle est obtenue à partir de l'équation ci-dessus simplifiée ($\ln \frac{A(t)}{A(t_0)} = -kt$) en mesurant l'activité de l'enzyme après différents temps d'incubation dans le milieu réactionnel.

Après calcul de k , le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) est déterminé comme suit :

$$t_{1/2} = - \frac{\ln 0,5}{k}$$

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

Dans le domaine des procédés enzymatiques, si les exemples de biocatalyse dans les liquides ioniques sont pléthoriques, ceux dans les MEP sont en revanche beaucoup plus rares. En 2010, année du commencement de ces travaux de thèse, une seule publication relatait l'utilisation de lipases en MEP. Dès lors, très peu de connaissances sur le comportement des lipases dans ces solvants avaient pu être extraites de la Littérature. L'information principale qui émanait de ladite publication était la supériorité de la lipase B immobilisée de *Candida antarctica* (iCALB) sur les autres biocatalyseurs, dans les réactions de biotransformation en mélanges eutectiques profonds (MEP). De ce fait, dans le but de valider le potentiel des MEP en tant que nouveaux milieux réactionnels « verts » adapté à la synthèse lipasique de molécules à haute valeur ajoutée, nous avons décidé de débiter nos travaux avec ce biocatalyseur.

La stratégie que nous avons adoptée a consisté dans un premier temps à évaluer le comportement de iCALB en milieu eutectique, au travers de deux paramètres : activité et stabilité, et d'une réaction modèle : l'alkoolyse du laurate de vinyle. Cette réaction a été choisie pour sa rapidité et sa simplicité, deux critères adaptés au screening d'une large gamme de MEP. Aussi, ces expériences ont permis d'acquérir des connaissances d'un point de vue « manipulatoire » et « comportemental » de ces solvants.

Dans un second temps, les MEP les plus prometteurs ont été appliqués à la synthèse lipasique de phénolipides, réaction dans laquelle la mise en œuvre de substrats de polarités très différentes constitue une difficulté majeure.

Enfin, ces travaux de thèse avaient pour objectif de comprendre l'organisation supramoléculaire et les paramètres qui influencent le plus la réactivité enzymatique dans ces milieux, dans l'espoir d'accroître et de diversifier leur utilisation.

PARTIE 1. SCREENING DES MELANGES EUTECTIQUES PROFONDS COMME MILIEUX REACTIONNELS POUR DES REACTIONS BIOCATALYSEES PAR LA LIPASE B DE CANDIDA ANTARCTICA (ICALB)

1.1 : Réaction d'alcoolyse du laurate de vinyle

1.1.1 : Conditions générales et présentation de la réaction

Les publications précédentes se rejoignent sur le fait que la lipase B de *Candida antarctica* s'avère être le meilleur biocatalyseur pour effectuer des réactions en mélanges eutectiques profonds (MEP) (Gorke *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2013). En ce sens, nous avons décidé d'utiliser cette enzyme pour analyser le potentiel de ces solvants en tant que milieu réactionnel pour la biocatalyse lipasique. La réaction modèle utilisée est l'alcoolyse du laurate de vinyle avec des alcools primaires de différentes longueurs de chaîne (butanol, octanol et octadécanol) (Figure 11). Le choix de cette réaction modèle a également été guidé par le fait que l'utilisation d'ester vinylique comme donneur d'acyle est un moyen rapide et efficace pour évaluer les activités des lipases. En effet, cette réaction permet le déplacement de l'équilibre de la réaction dans le sens favorable de la synthèse puisque l'alcool vinylique produit lors de la réaction est immédiatement isomérisé en acétaldéhyde, lui-même spontanément éliminé du milieu réactionnel en raison de sa forte volatilité. De plus, le fort coefficient d'absorption molaire du substrat vinylique de départ, permet de suivre facilement sa disparition au cours de la réaction par une méthode spectrophotométrique (Goujard *et al.*, 2009).

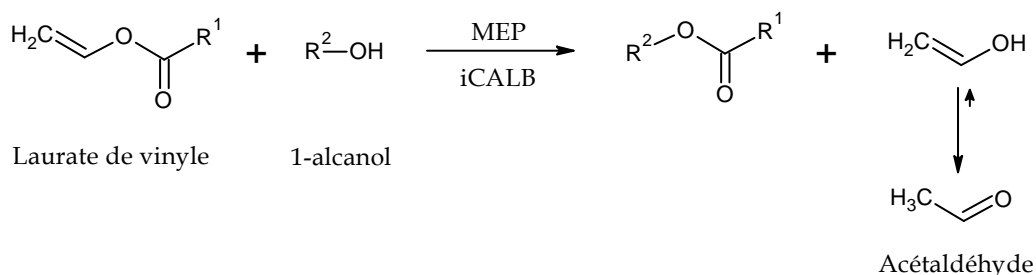


Figure 11 : Réaction d'alcoololyse du laurate de vinyle ($\text{R}^1=\text{C}_{11}\text{H}_{23}$) avec des alcools de différentes longueurs de chaînes ($\text{R}^2= \text{C}_4\text{H}_9$, C_8H_{17} ou $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$)

Dans cette étude, nous avons testé les sept mélanges (Figure 12) eutectiques les plus fréquemment décrits dans la littérature. Leur composition (combinaison de deux sels d'ammonium et cinq DLH) et leur ratio molaire sel/DLH à l'eutectique sont indiqués dans le Tableau 21.

De plus, le choix de ces milieux a également été fait dans le but d'obtenir des informations sur la réactivité des donneurs de liaison hydrogène. Dans les MEP en effet, le DLH, selon sa nature, peut jouer le rôle de nucléophile ou de donneur d'acyle et entrer en compétition avec l'un des substrats de la réaction. Les MEP à base d'urée, de glycérol ou d'éthylène glycol, peuvent concurrencer l'alcool (en tant que nucléophile) lors de la deuxième étape de la catalyse enzymatique, tandis que les MEP à base d'acides oxalique ou malonique, ces derniers peuvent concurrencer le laurate de vinyle comme donneur d'acyle lors de la première étape de la catalyse. C'est pourquoi la réactivité du donneur de liaison hydrogène est sans doute l'un des paramètres (en dehors de l'efficacité du catalyseur) les plus importants permettant de valider ou non si un MEP peut être un milieu propice aux réactions catalysées par la lipase. En plus de générer des sous-produits, la consommation du donneur de liaison hydrogène au cours de la réaction va modifier le ratio initial du mélange correspondant au point eutectique avec comme conséquences, une évolution de ses propriétés physico-chimiques (en particulier la viscosité), des difficultés de recyclage et un impact probable sur la catalyse enzymatique. En effet, bien qu'il ait été prouvé que certains MEP pouvaient atteindre leur niveau de viscosité minimal au voisinage du point eutectique, c'est à l'eutectique précisément que les MEP à base de chlorure de cholinium sont les moins visqueux. De ce fait, un changement de composition du

mélange peut entraîner une augmentation considérable de la viscosité, à l'origine de problèmes d'homogénéisation et de transferts de masse. Ce phénomène sera d'autant plus important que la viscosité initiale du MEP est élevée, comme par exemple avec les MEP à base d'acides dicarboxyliques.

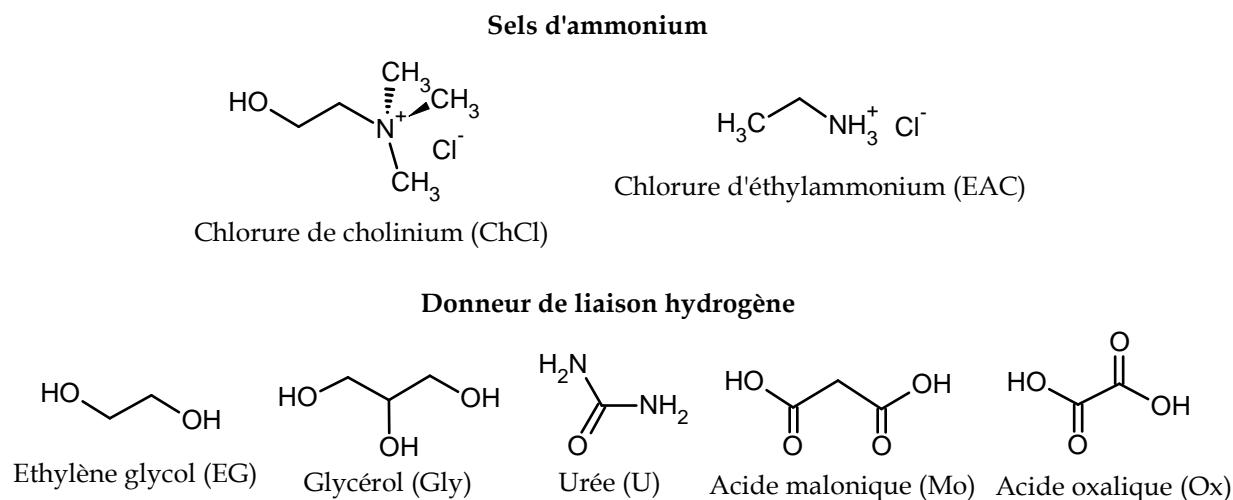


Figure 12 : Structure des molécules utilisées pour la synthèse des MEP

MEP	Sel d'ammonium	Donneur de liaison hydrogène	Ratio molaire
ChCl:U	Chlorure de cholinium	Urée	1:2
ChCl:gly	Chlorure de cholinium	Glycérol	1:2
ChCl:Ox	Chlorure de cholinium	Acide oxalique	1:1
ChCl:Mo	Chlorure de cholinium	Acide malonique	1:1
ChCl:EG	Chlorure de cholinium	Ethylène glycol	1:2
EAC:U	Chlorure d'éthylammonium	Urée	1:2
EAC:gly	Chlorure d'éthylammonium	Glycérol	1:2

Tableau 21 : Composition et ratio molaire des différents MEP synthétisés

Avant d'aborder la phase de screening, il nous a paru nécessaire de déterminer quels paramètres étaient susceptibles d'avoir un impact sur la réaction d'alcoololyse catalysée par iCALB dans ce type de solvant. Tout d'abord, nous avons constaté que sans broyage préalable du catalyseur, il était difficile d'obtenir une cinétique rapide et des résultats reproductibles, de telle sorte qu'il était impossible de déterminer

l'activité spécifique de l'enzyme. Nous savons que les MEP présentent des propriétés de solvation inhabituelles qui sont fortement influencées par des liaisons hydrogène et se traduisent par une forte affinité pour les composés protiques. Par ailleurs, même si la fluidité peut être ajustée, en fonction de la nature du donneur de liaison hydrogène et du sel d'ammonium, la viscosité du MEP est sensiblement plus forte que celle de la plupart des solvants conventionnels (mais proche des liquides ioniques), entraînant une limitation du transfert de masse et des difficultés de dispersion du catalyseur (iCALB). Pour toutes ces raisons, il était très difficile d'obtenir une homogénéisation efficace dans ces milieux avec un catalyseur non broyé. Ce problème était aussi peut-être dû à la nature du support d'immobilisation de l'enzyme, une résine acrylique macroporeuse correspondant à des particules en forme de billes hydrophobes et aprotiques avec un diamètre compris entre 0,3 et 0,9 mm et avec une densité bien inférieure à celles des milieux réactionnels. En conséquence, la lipase iCALB a été broyée et la fraction granulométrique de 100 à 165 μ m sélectionnée pour la suite de l'étude. Il est probable que ce problème aurait aussi pu être contourné en augmentant le volume réactionnel et/ou la force d'homogénéisation, mais le but était avant tout d'obtenir une reproductibilité des résultats et de pouvoir déterminer les cinétiques réactionnelles en minimisant les quantités de substrats, solvant et catalyseur.

Par ailleurs, la nature des MEP font de ces solvants des milieux très fortement hygroscopiques comme en attestent les mesures d'absorption d'eau effectuées dans des environnements clos en présence de solutions salines saturées dont la capacité à réguler l'activité thermodynamique de l'eau (a_w) varie (Figure 13). Les résultats obtenus avec deux MEP (ChCl:Gly et ChCl:U) ont montré que, quel que soit la solution aqueuse saturée en sel utilisée (Figure 13), l'équilibre n'était pas atteint après une longue période d'incubation (26 jours à 25°C), et que les teneurs en eau des MEP étaient très élevées. Il semble donc, au vu de ces expériences, que le MEP soit capable de déshydrater la solution aqueuse utilisée pour fixer l' a_w dans l'environnement clos.

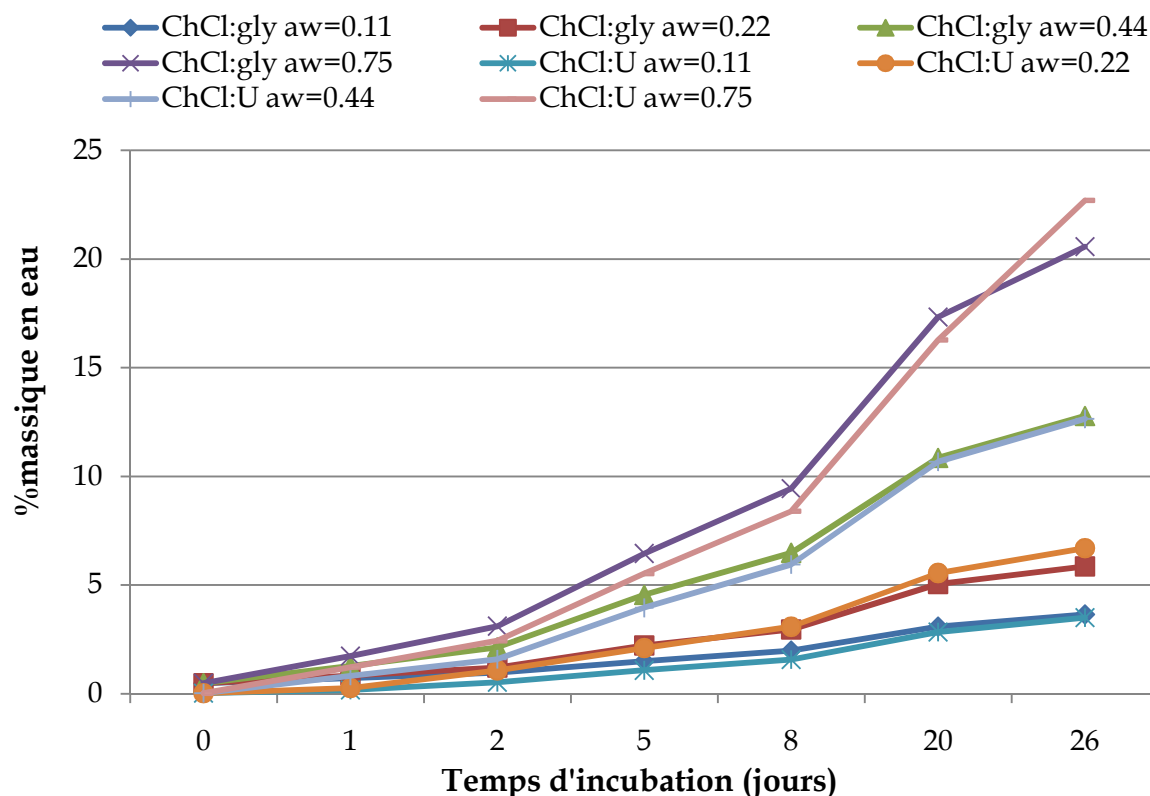


Figure 13 : Pourcentage massique en eau dans les MEP (ChCl:U et ChCl:Gly) après 26 jours d'incubation sous atmosphère à a_w contrôlée par différentes solutions aqueuses saturées en sel (a_w 0,11 = LiCl, a_w 0,22 = CH_3COOK , a_w 0,44 = K_2CO_3 , a_w 0,75 = NaCl).

Le principal enseignement tiré de ces expériences, est la nécessité d'isoler le milieu réactionnel de l'humidité ambiante (réaction en flacon hermétiquement clos) afin d'éviter toute absorption d'eau.

Par ailleurs, l'eau a la particularité d'être impliquée dans un grand éventail d'interactions et est bien connue pour avoir un rôle crucial dans l'organisation tridimensionnelle des macromolécules telles que les enzymes. L'eau associée à la protéine est déterminante et l'activité de l'enzyme peut être sensiblement influencée par son état d'hydratation. De plus, dans les réactions de synthèse telles que l'estérification ou les transestérifications, l'excès d'eau peut favoriser la réaction inverse d'hydrolyse. D'autre part, l'eau étant l'un des plus simples et des plus forts donneurs de liaison hydrogène qui soit, sa présence doit être aussi faible que possible dans le MEP afin d'éviter toute modification éventuelle de la composition initiale de l'eutectique. Le Tableau 22 ci-dessous résume la teneur en eau des MEP testés. Ces

valeurs, inférieures à 0.75% (p/p) dans tous les cas, correspondent au niveau d'hydratation mesuré immédiatement après leur synthèse. Dans le cas présent, l'activité thermodynamique de l'eau (a_w) du biocatalyseur a été préalablement ajustée à 0,44.

MEP	ChCl:U	ChCl:Gly	ChCl:Ox	ChCl:Mo	ChCl:EG	EAC:U	EAC:Gly
%massique en eau	0.04	0.14	0.75	0.18	0.08	0.27	0.31

Tableau 22 : Pourcentage massique en eau déterminé des MEP immédiatement après leur synthèse.

1.1.2 : Alcoolyse du laurate de vinyle avec des alcools de différentes longueurs de chaîne

Nous avons réalisé l'alcoolyse du laurate de vinyle avec des alcools aliphatiques de différentes longueurs de chaîne afin d'évaluer l'influence de la polarité du substrat nucléophile sur les conversions et sélectivités. Nous avons déjà expliqué l'importance et le rôle de la liaison hydrogène sur la solubilité des composés dans ces solvants. De ce fait, en supposant que l'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle de l'alcool diminue sa solubilité, différents alcools primaires ayant 4, 8 et 18 atomes de carbone (1-butanol, 1-octanol et 1-octadécanol) ont été évalués. Ces réactions ont été conduites pendant 16 heures à 60°C dans les sept MEP présélectionnés en utilisant la lipase iCALB préalablement broyée. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus dans le toluène, un solvant organique de point d'ébullition supérieur à celui de l'hexane, qui est largement utilisé en synthèses lipasiques et particulièrement adapté à la conversion des substrats hydrophobes à haute température.

Les résultats de conversion du laurate de vinyle par les différents alcools sont indiqués dans le Tableau 23 ci-après.

	1-Butanol	1-Octanol	1-Octadécanol
Solvants	Conversion (%)	Conversion (%)	Conversion (%)
Toluène	100	100	100
ChCl:U	100	100	100
ChCl:gly	100	100	100
ChCl:Ox*	10	43	41
ChCl:Mo*	5	36	34
ChCl:EG*	33	8	10
EAC:U	94	10	9
EAC:gly	3	4	4

* Réactivité du donneur de liaison hydrogène.

Tableau 23 : Conversion du laurate de vinyle dans les réactions d'alcoolyse en utilisant différents alcools primaires dans plusieurs MEP et dans le toluène à 60°C pendant 16 heures. Laurate de vinyle (40µmol), alcools (240µmol), iCALB (1mg), solvant (1ml).

Très clairement, deux MEP se sont révélés être particulièrement adapté à cette réaction. En effet, quel que soit l'alcool, ChCl:U et ChCl:Gly permettent une conversion quantitative du laurate de vinyle en ester correspondant, avec des résultats comparables à ceux obtenus dans le toluène.

Dans les MEP à base de diacides carboxyliques (oxalique et malonique), les résultats ont montré une activité enzymatique faible pour l'alcoolyse du laurate de vinyle avec le butanol (conversion $\leq 10\%$). En revanche, de plus grandes activités ont été observées pour les réactions d'alcoolyse en présence d'octanol ou d'octadécanol avec des taux de conversion respectivement de 34 et 43%.

Dans ChCl:EG et EAC:U, les meilleurs taux de conversions ont été obtenus avec l'alcool ayant la chaîne la plus courte (respectivement 33% et 94% avec le butanol). Dans ces mêmes solvants, des résultats de conversion beaucoup plus faibles ont été relevés pour des chaînes plus longues (octanol et octadécanol).

Enfin, de tous les solvants testés, c'est dans EAC:Gly que la plus faible activité enzymatique a été observée, quel que soit l'alcool utilisé.

En définitive, même si les solvants à base d'EAC ont une viscosité beaucoup plus faible que celles des MEP à base de ChCl (ce qui pourrait constituer un avantage en termes de transfert de masse et de dispersion des enzymes immobilisées) les meilleures activités sont observées avec les MEP ayant le chlorure de cholinium comme sel cationique. En particulier, lorsque ce dernier est associé avec le glycérol ou l'urée pour lesquels des conversions quantitatives, quelle que soit la longueur de la chaîne de l'alcool, sont constatées. De plus, les MEP basés sur ce sel d'ammonium quaternaire semblent être le meilleur choix pour réaliser de futures expériences. En effet, le chlorure de cholinium est un produit chimique facilement disponible et produit à l'échelle industrielle selon un procédé générateur de peu de déchets. Utilisé comme additif dans l'alimentation des volailles, il est non-toxique et particulièrement biodégradable. Par conséquent, nous avons trouvé légitime de focaliser l'essentielle de nos futures expériences avec ces deux solvants.

1.1.3 : Réactivité du donneur de liaison hydrogène du MEP

Nous avons observé que lorsque le glycérol et l'urée étaient utilisés en tant que composants du MEP, quasiment aucune réactivité secondaire n'était observée. En d'autres termes, les réactions d'alcoolyse testées peuvent être réalisées sans obtenir de produits secondaires résultant d'une activité nucléophile de l'urée ou du glycérol sur le laurate de vinyle.

En revanche lorsque l'éthylène glycol est utilisé comme donneur de liaison hydrogène, une formation importante de produits secondaires due à la réactivité nucléophile du diol sur le laurate de vinyle est observée. Ainsi, dans ChCl:EG et en l'absence de tout alcool, 65% du laurate de vinyle est converti en éthylène glycol mono-et di-laurate après 16 heures à 60 ° C (Figure 14 et Figure 15).

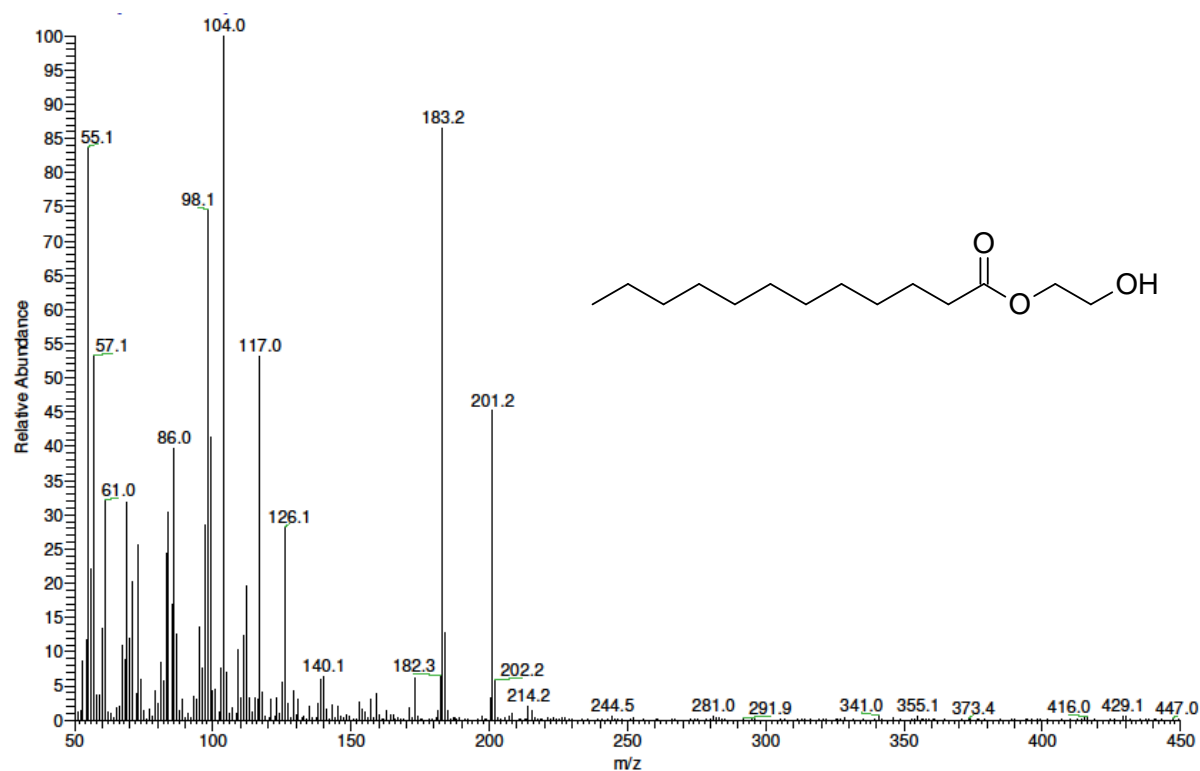


Figure 14 : Fragmentation de l'éthylène glycol mono laurate en spectrométrie de masse (GC/EI-MS).

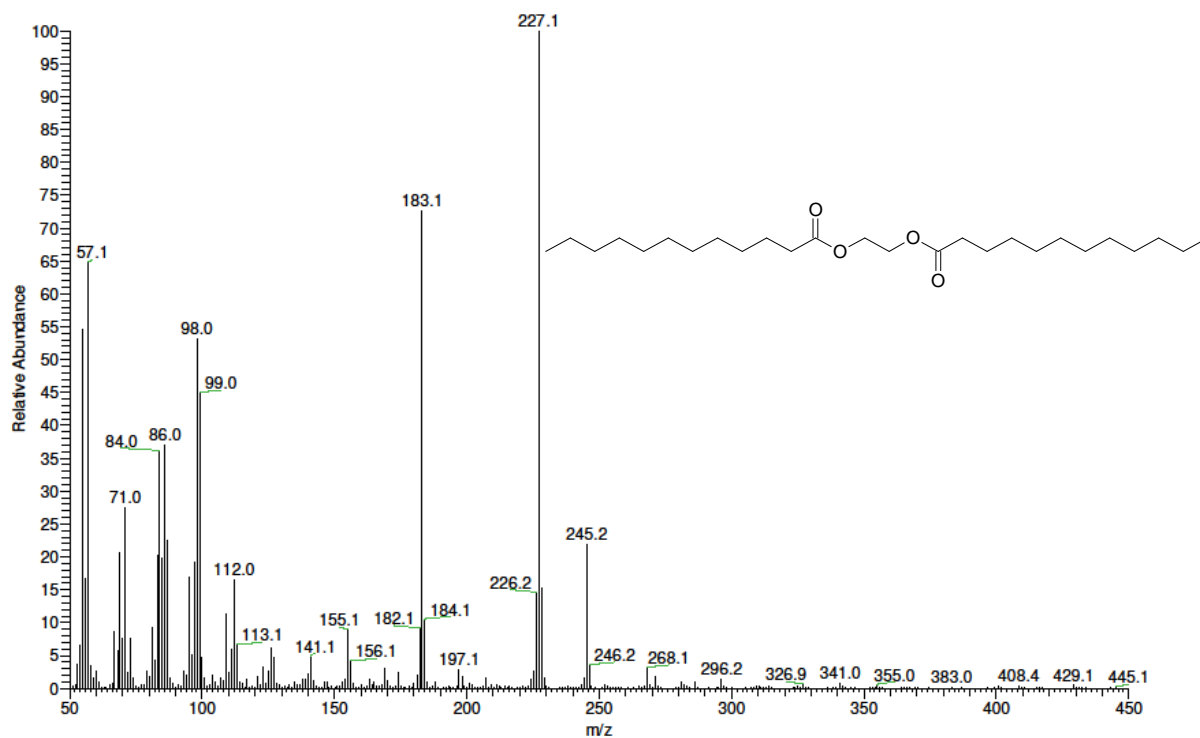


Figure 15: Fragmentation de l'éthylène glycol di laurate en spectrométrie de masse (GC/EI-MS).

D'autre part, la réactivité du donneur de liaison hydrogène dans ChCl:EG peut être influencée par la présence et la nature du substrat. En effet, en présence de 1-butanol, 1-octanol ou 1-octadécanol, la réactivité de l'éthylène glycol sur le laurate de vinyle est considérablement réduite avec des taux de conversion en éthylène glycol mono-et di-laurate respectivement de 23%, 6% et 7%. Toutefois, des rendements très faibles en laurate d'alkyle (produit souhaité de la réaction) ont été observés quelle que soit la longueur de la chaîne de l'alcool (10%, 2% et 3% respectivement).

Dans les MEP à base de diacides (ChCl:Ox et ChCl:Mo), la réactivité est encore plus surprenante. En effet, une formation importante de mono et diester issus de la réactivité des diacides du MEP a été observée, en particulier avec les alcools à chaîne moyenne. La réactivité entre les diacides et le butanol s'est avérée très faible alors qu'elle était beaucoup plus élevée avec l'octanol (Figure 16 et Figure 17, Figure 18 et Figure 19). Avec l'alcool à longue chaîne (octadécanol) nous avons observé une formation significative d'octadécyle mono ester issu de l'acide malonique (Figure 2020) alors qu'une faible réactivité a été observée avec l'acide oxalique. Néanmoins, contrairement aux résultats obtenus avec ChCl:EG, aucune différence dans la réactivité des donneurs de liaison hydrogène n'a été observée en présence ou non du substrat compétitif (laurate de vinyle).

De façon générale, la consommation du donneur de liaison hydrogène augmente la viscosité du mélange conduisant à une diminution de la mobilité ionique et du transfert de masse, par voie de conséquence. Par ailleurs, les MEP à base de diacides carboxyliques ont une viscosité initiale élevée par rapport aux autres mélanges. De ce fait, leur réactivité dans la réaction catalysée par une lipase augmente sensiblement ce problème qui devient un obstacle à l'homogénéisation du milieu. A cet égard, l'utilisation de ce type de milieux pour des réactions biocatalysées par les lipases ne semble pas être un choix judicieux. Toutefois, il pourrait être tiré profit de cet inconvénient en utilisant ce donneur de liaison hydrogène comme solvant et substrat dans une réaction de transestérification. Néanmoins dans ce cas précis, l'augmentation drastique de la viscosité induite par la consommation du DLH pourrait considérablement limiter cette application.

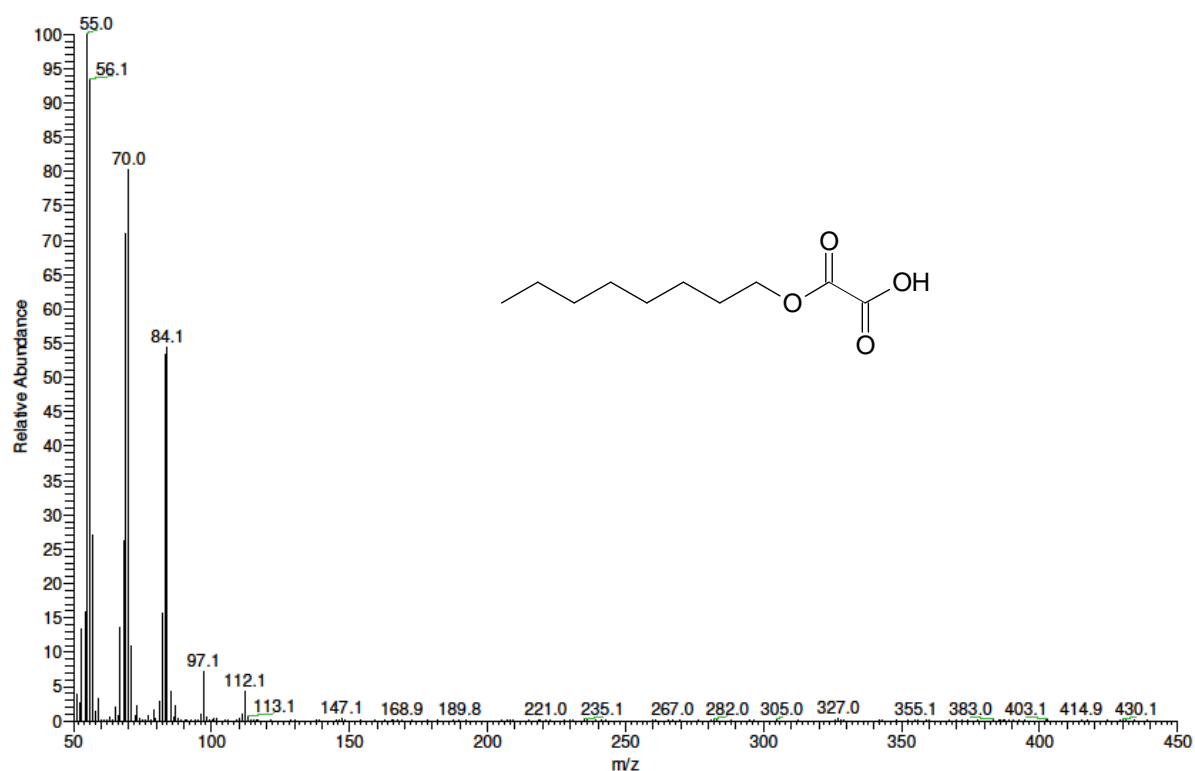


Figure 16 : Fragmentation du mono octyle oxalate en spectrométrie de masse (GC/EI-MS).

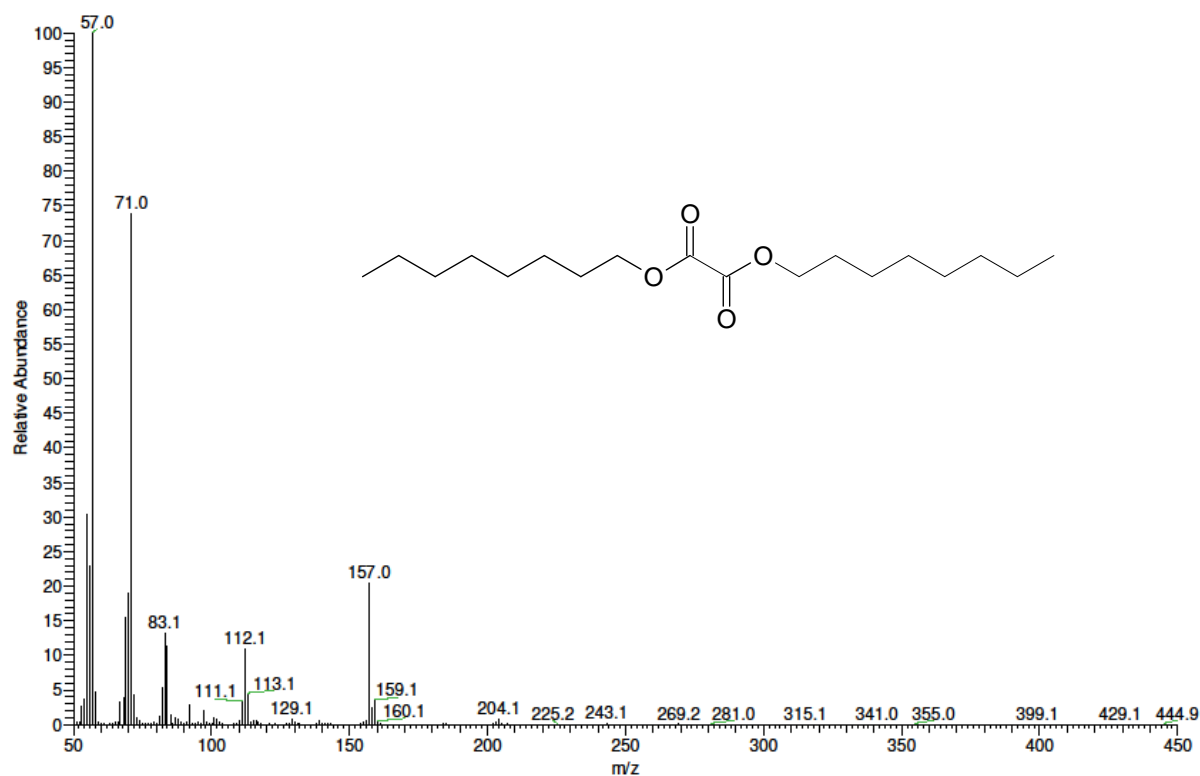


Figure 17 : Fragmentation du di octyle oxalate en spectrométrie de masse (GC/EI-MS).

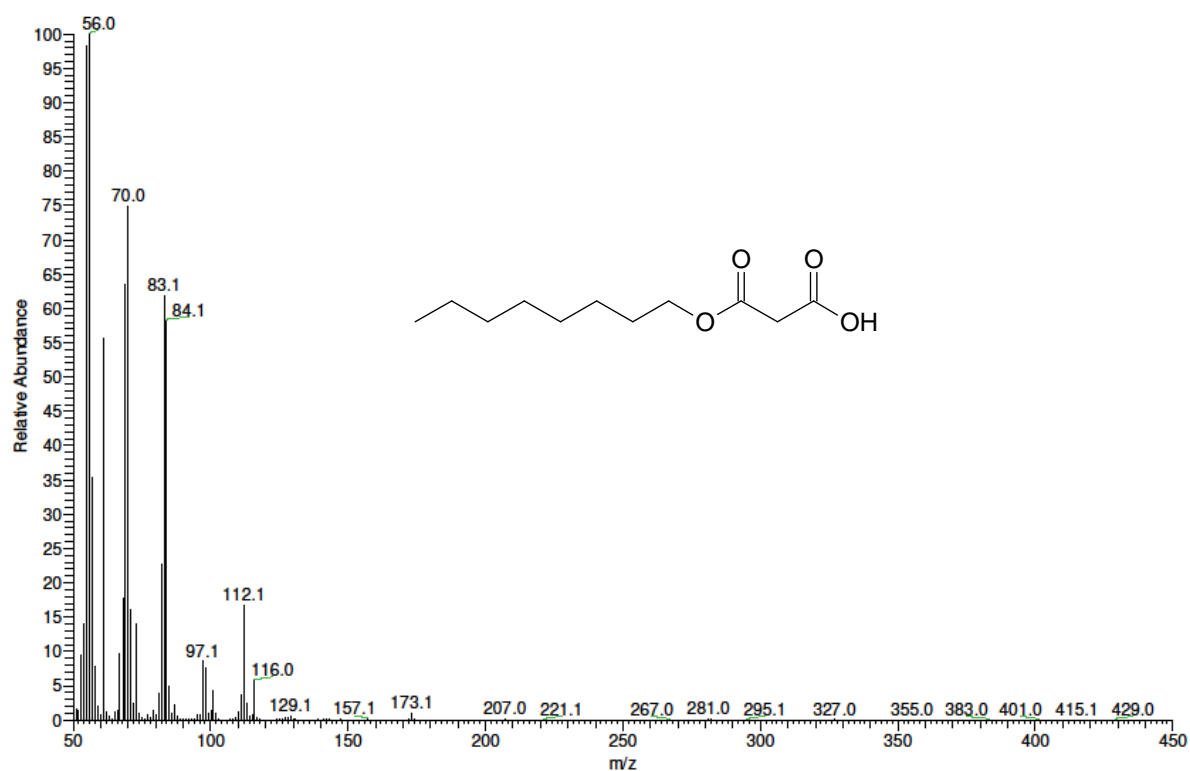


Figure 18 : Fragmentation du mono octyle malonate en spectrométrie de masse (GC/EI-MS).

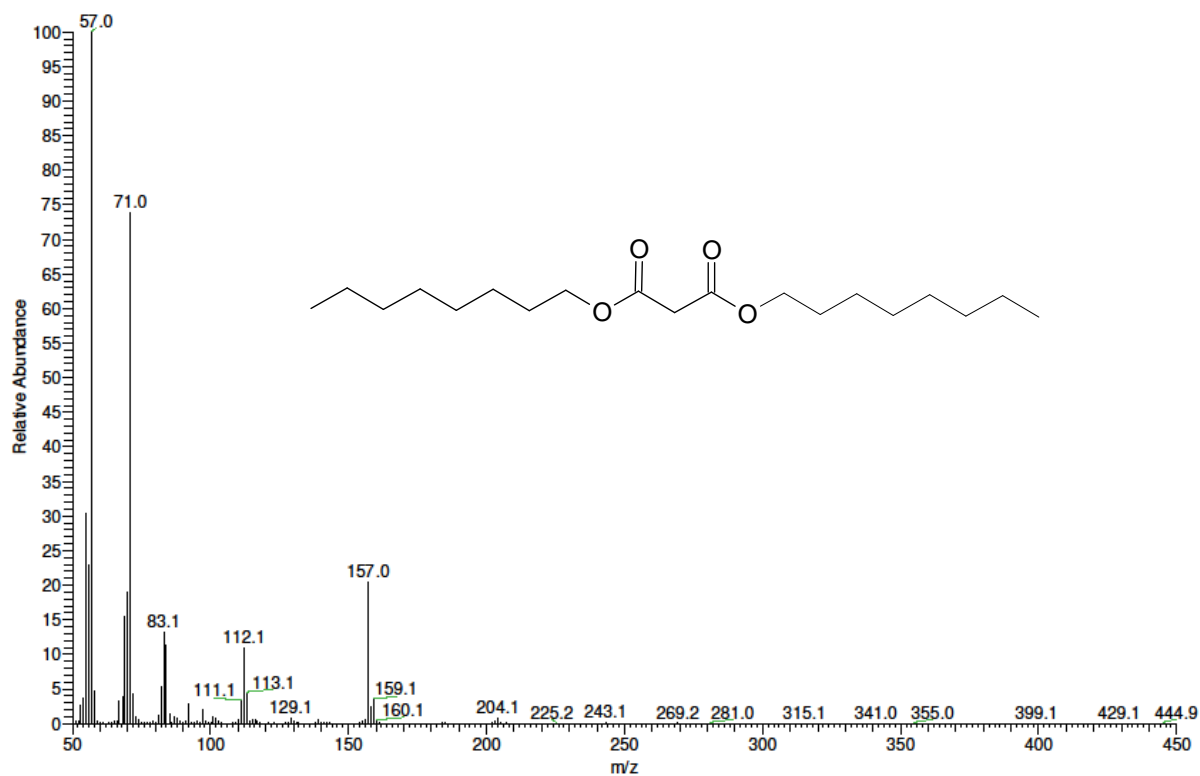


Figure 19 : Fragmentation du di octyle malonate en spectrométrie de masse (GC/EI-MS).

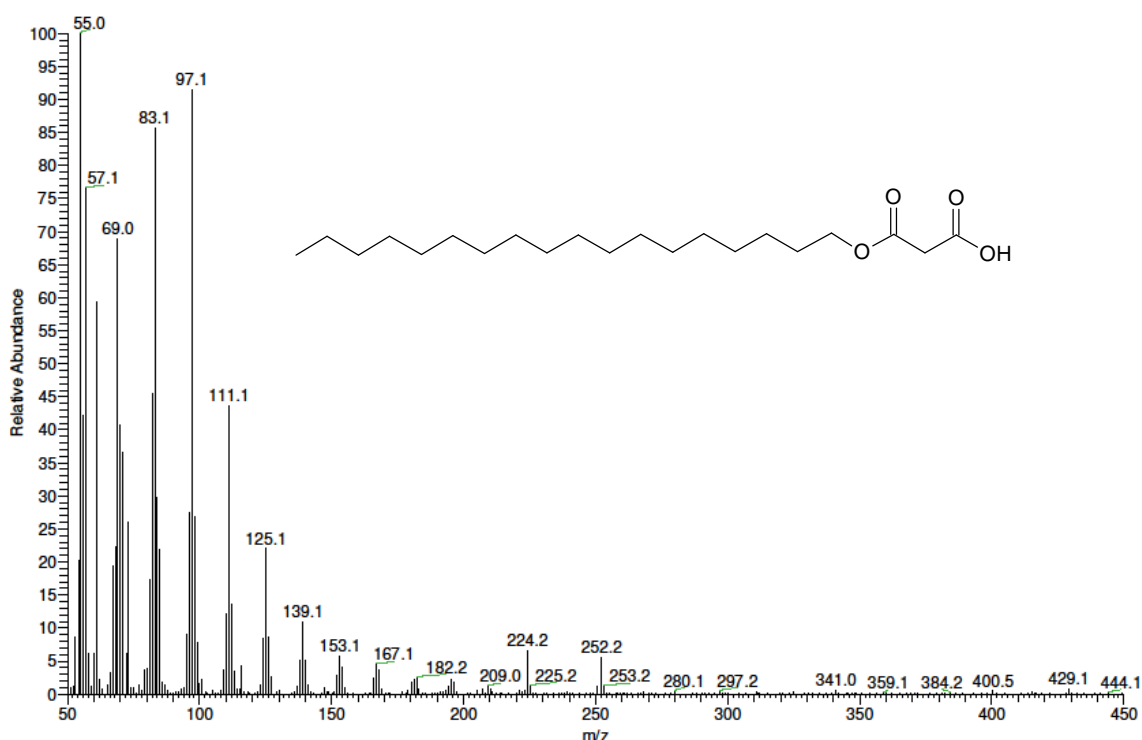


Figure 20 : Fragmentation du mono octadécyle malonate en spectrométrie de masse (GC/EI-MS).

En résumé, ces travaux montrent que la polarité de l'alcool utilisé pour la réaction d'alcoolyse en MEP peut avoir un effet primordial sur l'activité et la sélectivité de la lipase iCALB. De même, ces résultats renseignent sur la réactivité du donneur de liaison hydrogène (DLH) impliqué dans la formation du solvant, qui varie de façon considérable selon le MEP. Ainsi, certains DLH peuvent être fortement impliqués dans des réactions électrophiles ou nucléophiles dans le milieu, alors que d'autres le seront beaucoup moins.

En partant du principe qu'un « bon » solvant doit être inerte vis à vis de la réaction souhaitée, il semble évident qu'un certain nombre de MEP (en particulier ceux à base de diacides carboxyliques) ne pourront être judicieusement utilisés et auront peu d'applications, à l'inverse des MEP à base de DLH, peu ou pas réactif, comme l'urée et le glycérol. On pourrait déduire de cette observation que l'association intermoléculaire dans ce type de solvant est supérieure aux autres MEP testés. En effet, en partant du principe que la réactivité nucléophile intrinsèque des molécules

de glycérol et d'éthylène glycol est extrêmement proche, les différences d'activités observées peuvent être attribuées à des forces d'associations différentes dans les MEP correspondants. Évidemment, cette interprétation aurait été particulièrement pertinente si la réaction n'était pas catalysée par une enzyme, réaction pour laquelle d'autres paramètres (en particuliers l'affinité de substrat) peuvent intervenir.

1.1.4 : Etudes comparatives des activités spécifiques de iCALB dans ChCl:U, ChCl:Gly et le toluène.

En utilisant toujours le même modèle de réaction, nous avons mesuré les activités spécifiques et la stabilité de l'enzyme iCALB dans ChCl:U et ChCl:Gly, et comparé ces valeurs à celles obtenues dans le toluène.

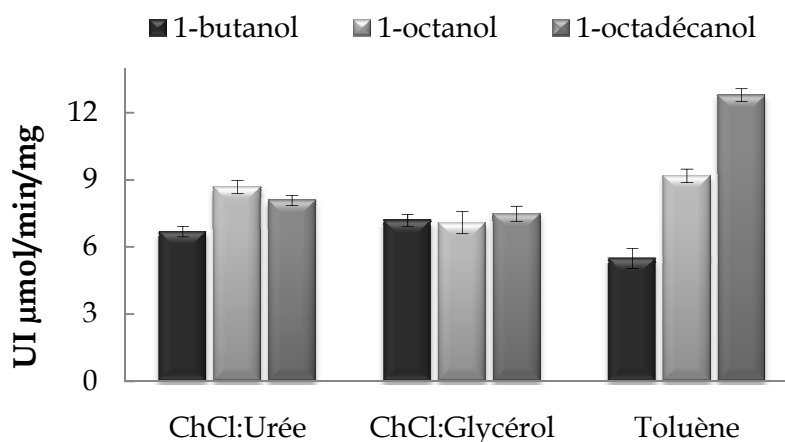


Figure 21 : Mesure de l'activité spécifique pour les réactions d'alcoolyses du laurate de vinyle en utilisant différents alcools primaires dans ChCl:U, ChCl:Gly et le toluène à 60°C. Laurate de vinyle (40μmol), alcools (240μmol), iCALB (1mg), solvant (1ml).

Les résultats (Figure 21) montrent que l'influence de la longueur de la chaîne de l'alcool sur les activités spécifiques est plus importante dans le toluène que dans les deux MEP. L'augmentation de l'hydrophobie des alcools permet d'améliorer la réactivité dans le toluène, alors qu'elle est peu significative dans ChCl:U et surtout ChCl:Gly.

Par ailleurs, des travaux précédents (Abbott *et al.*, 2003) ont montré que la viscosité des MEP changeait considérablement en fonction de la température. L'un des exemples les plus significatifs est obtenu avec ChCl:U, pour lequel une augmentation de température de 20°C à 50°C, permet de diminuer d'un facteur 10 la viscosité du solvant. Par conséquent, l'augmentation de la température de réaction représente l'un des moyens possibles de favoriser le transfert de masse et la dispersion d'une enzyme immobilisée dans les MEP.

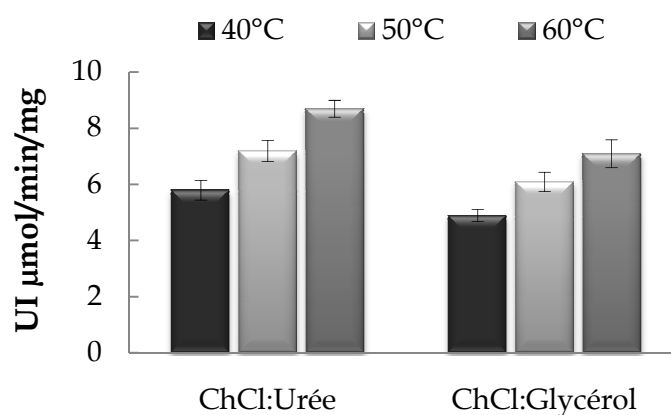


Figure 22 : Activité spécifique de iCALB dans la réaction d'alcoolyse du laurate de vinyle par le 1-octanol dans ChCl:U et ChCl:Gly à 40°C, 50°C et 60°C. Laurate de vinyle (40μmol), 1-octanol (240μmol), iCALB (1mg), solvant (1ml).

Comme le montre la Figure 22, l'activité spécifique (exprimée en μmol/min/mg) est 1,5 fois plus élevée à 60°C qu'à 40°C dans ChCl:U et ChCl:Gly.

En conséquence, une des stratégies envisageables lorsque l'on utilise des lipases immobilisées, avec une stabilité thermique élevée, serait d'augmenter la température de réaction jusqu'à la stabilité opérationnelle maximale de l'enzyme ce qui permettrait de minimiser le problème lié à la viscosité des MEP.

1.1.5 : Activité résiduelle de la lipase iCALB dans ChCl:U et ChCl:Gly

Une autre limite à l'utilisation d'un MEP comme solvant pour des réactions catalysées par les lipases peut être la stabilité des enzymes dans de tels solvants. L'activité catalytique initiale et résiduelle du biocatalyseur va de pair avec l'environnement protéique et donc, la nature du milieu réactionnel. Par exemple, nous avons déjà souligné l'influence de l'hydrophobicité des solvants organiques sur la stabilité des lipases, qui sera d'autant plus forte que le solvant sera hydrophobe. Dans le cas des MEP, et plus généralement des liquides ioniques dont la similitude avec les MEP est plus proche, il est beaucoup plus difficile d'établir une telle relation de causalité, tant leur richesse structurale est grande et leurs propriétés physico-chimiques singulières. Malgré tout, nous pouvons spéculer sur le fait que les MEP ne sont pas, a priori, les milieux les plus favorables à une bonne stabilité protéique. En effet, les donneurs de liaisons hydrogène puissants (comme l'urée par exemple) et l'ion chlorure, n'ont pas la réputation d'être de bons éléments pour favoriser et maintenir la stabilité enzymatique.

C'est pourquoi, afin de valider cette hypothèse, nous avons effectué une évaluation de la stabilité à long terme de la lipase iCALB dans ChCl:U, ChCl:Gly et le toluène, ce dernier étant pris comme référence (Figure 23). La lipase a été incubée dans chaque solvant pendant 1, 2, 3, et 5 jours à 50°C avant de déterminer l'activité spécifique sur l'hydrolyse du laurate de vinyle avec le 1-octanol.

Dans le toluène, une perte d'activité de seulement 15% a été observée après cinq jours, ce qui confirme l'effet peu dénaturant d'un environnement hydrophobe pour la lipase.

Dans ChCl:Gly, une diminution d'activité de 70% a été mesurée après un jour d'incubation (65% au bout de 2 heures). Cependant, l'augmentation de la durée d'incubation jusqu'à 5 jours n'a pas entraîné de diminution supplémentaire de l'activité enzymatique. En d'autres termes, si l'on compare les activités spécifiques après quelques minutes et après plusieurs jours, aucune différence significative au niveau des cinétiques n'est observée. Ainsi, dans ChCl:Gly, iCALB maintient une

activité constante sans aucune modification apparente après plusieurs jours d'incubation. On suppose que dans ce solvant quelques minutes sont nécessaires au catalyseur pour avoir une activité catalytique stable. En effet, le glycérol est connu pour avoir un effet négatif sur l'activité et la stabilité de la lipase en s'adsorbant sur le catalyseur ce qui peut réduire la diffusion du substrat hydrophobe vers le site actif de la lipase (Dossat *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2011). De ce fait, ChCl:Gly ne constitue pas un environnement dénaturant pour l'enzyme.

Dans ChCl:U en revanche, iCALB perd 5% d'activité après une incubation de 24 h et presque 40% après 5 jours. Dans ce solvant, une diminution lente mais progressive de l'activité spécifique résiduelle est observée.

Au vu de ces résultats, nous pouvons constater que le donneur de liaison hydrogène (DLH) impact sur la stabilité de la lipase iCALB. A ce titre, nous pensons que le glycérol en tant que DLH est beaucoup moins dénaturant que l'urée pour la protéine. De plus, la stabilité de iCALB dans les MEP est somme toute comparable à ce que l'on observe dans le toluène, solvant organique connu pour être que peu désactivant pour l'enzyme.

En conclusion, la stabilité de iCALB dans ces deux solvants et en particulier dans ChCl:Gly est encourageante ce qui devrait permettre de mettre en œuvre ce catalyseur dans des réactions longues (plusieurs jours) et plus complexes. Avec cette étude nous confirmons l'idée de Gorke *et al.*, selon laquelle la stabilité inattendue des enzymes dans les MEP peut être expliquée par l'important réseau de liaisons hydrogène au sein du mélange, réseau qui abaisse la disponibilité et donc l'effet des composants (Gorke *et al.*, 2008).

Cependant, nous pensons que des études de stabilité de la lipase sur des modèles réactionnels avec des énergies d'activation et des affinités pour le substrat plus grandes devront être réalisées pour juger avec plus de crédit et de précision l'activité résiduelle des enzymes dans de tels solvants.

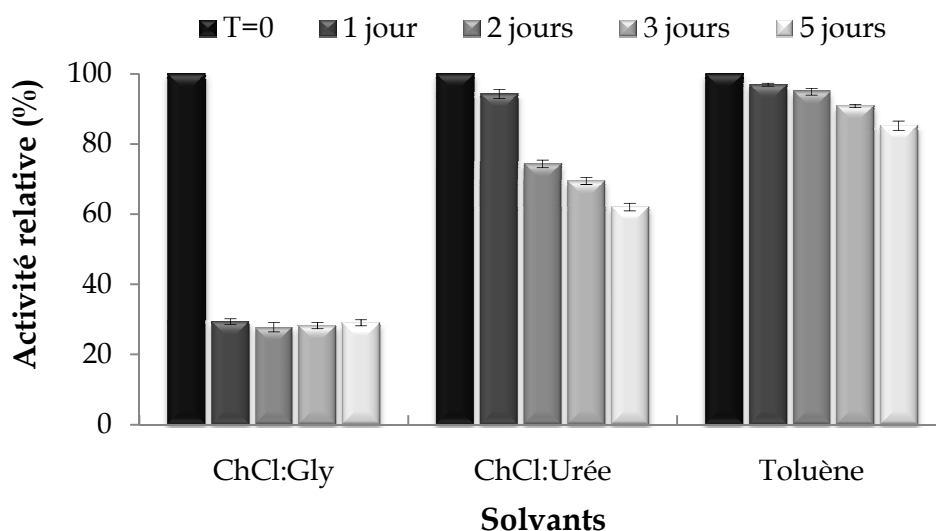


Figure 23 : Mesure de l'activité spécifique résiduelle après 1, 2, 3 ou 5 jours d'incubation, sur la réaction d'alkoolyse du laurate de vinyle par le 1-octanol dans ChCl:U, ChCl:Gly et le toluène à 50°C. Laurate de vinyle (40 μ mol), 1-octanol (240 μ mol), iCALB (1mg), solvant (1ml).

1.1.6 : Conclusion

Evidemment, la réalisation avec succès de ce type de réaction modèle (alkoolyse du laurate de vinyle) n'apporte pas vraiment d'évolution sur les synthèses enzymatique dans le sens où cette réaction peut être réalisée très simplement et ne présente aucune difficulté particulière. En revanche, cette stratégie nous a permis d'acquérir des informations essentielles sur le comportement et le potentiel des MEP en biocatalyse lipasique.

En effet, cette première partie expérimentale aura permis de constater que deux des solvants étudiés, à savoir ChCl:U et ChCl:Gly, pouvaient être utilisés de façon prometteuse en catalyse lipasique avec (i) d'excellents résultats en termes de conversion, (ii) une absence de réactivité de la part de ces constituants et enfin (iii) des résultats encourageant concernant la stabilité du catalyseur.

A présent, l'étape qui découle logiquement de cette série d'expériences consiste en la réalisation de réactions biocatalysées plus complexes et délicates dans ce type de solvant. En effet, nous avons déjà souligné les difficultés inhérentes à la lipophilisation d'acides phénoliques et l'intérêt que nous y portions. C'est la raison

pour laquelle notre démarche expérimentale a consisté à tester les MEP les plus performants (ChCl:U et ChCl:Gly) pour la biosynthèse de dérivés lipophiles de ces composés.

PARTIE 2. UTILISATION DE ChCl:U ET ChCl:Gly POUR LA LIPOPHILISATION DE COMPOSES PHENOLIQUES

2.1 : Réaction d'alcoolyse de composés phénoliques avec le 1-octanol

2.1.1 : Conditions générales et présentation de la réaction

Jusqu'à présent toutes les biotransformations utilisant les lipases dans les MEP ont été effectuées avec des substrats qui avaient peu d'affinité pour le solvant. L'une des difficultés qui apparaît à présent est la réalisation de bioconversion de substrats capable d'établir des interactions (principalement de type liaison hydrogène) avec la matrice de ces solvants. En effet, nous avons émis l'hypothèse que la très faible réactivité des donneurs de liaison hydrogène était très certainement due aux liaisons intermoléculaires non-covalentes très fortes qui s'y établissaient. Aussi, la modification enzymatique de substrats polaires (qui plus est protiques) en utilisant un MEP comme milieu réactionnel, constitue t-elle un véritable challenge.

Ainsi, le défi de cette approche est double : d'une part maîtriser la réactivité d'un substrat particulièrement polaire en MEP, et d'autre part améliorer l'efficacité des réactions catalysées par la lipase avec des substrats de deux polarités différentes. En effet que ce soit pour les esters de sucres, les lipoaminoacides ou les phénolipides, il est connu que la principale difficulté de ce genre de réactions biocatalysées par les lipases réside dans la forte différence de polarité des deux substrats mis en œuvre (sucre ou acide aminé ou composé phénolique devant réagir avec une chaîne grasse hydrophobe) (Villeneuve, 2007).

La réaction de lipophilisation de composés phénoliques mise en œuvre a consisté en l'alcoolyse du méthyl *p*-coumarate (40 mM) en présence de 1-octanol (240 mM) dans un ratio molaire de 1:6, en utilisant iCALB comme biocatalyseur à 60°C (Figure 24).

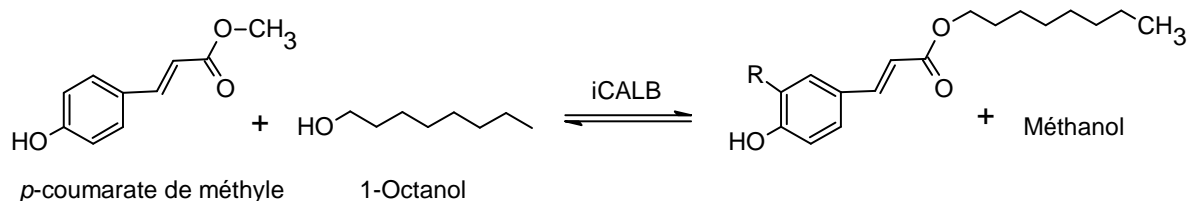


Figure 24 : Réaction d'alcoolyse du *p*-coumarate de méthyle par le 1-octanol par catalyse lipasique.

Toute étude expérimentale nécessite la mise au point d'un système analytique fiable pour permettre une juste interprétation des résultats. De ce fait et avant de réaliser cette réaction, il était indispensable de trouver une méthode analytique efficace et reproductible afin d'en suivre l'avancement.

2.1.2 : Mise au point de la méthode analytique

Nous avons constaté que l'extraction à l'aide de solvant organique des composés polaires solubilisés dans un MEP était difficile à réaliser, d'autant plus que le nombre de groupements fonctionnels capables de former des liaisons hydrogène intermoléculaires au sein de la molécule augmentait. Concernant l'extraction d'un même composé lipophilisé avec des longueurs de chaîne hydrophobe différentes, celle-ci était d'autant plus performante que la longueur de la chaîne hydrophobe augmentait. Ces approches d'extraction non concluantes car peu fiables et peu reproductibles nous ont contraint à tester d'autres méthodes.

Ainsi, nous avons pensé que la meilleure méthode était de solubiliser tout le milieu réactionnel à l'aide d'un solvant organique et d'analyser le mélange homogène à l'aide d'une technique séparative de type HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance). La solubilisation simultanée du MEP, des substrats et des produits lipophilisés peut être parfaitement réalisée grâce à un mélange binaire de méthanol et d'acétonitrile dans un ratio volumique de 1 pour 2. La méthode

analytique que nous avons développée consiste en la séparation des molécules du milieu réactionnel par chromatographie HILIC (chromatographie à interactions hydrophiles). Ce concept, introduit en 1990 par Andrew Alpert (Alpert, 1990), permet la mise au point d'un système efficace et reproductible dans le domaine des sciences séparatives. Cette méthode combine les caractéristiques des trois méthodes majeures en HPLC : phase inverse (CPI), phase normale (CPN) et ionique (CI).

Elle peut se résumer comme étant une méthode chromatographique de rétention en phase normale de composés polaires ou ioniques utilisant des conditions éluantes de phase inverse (Figure 25).

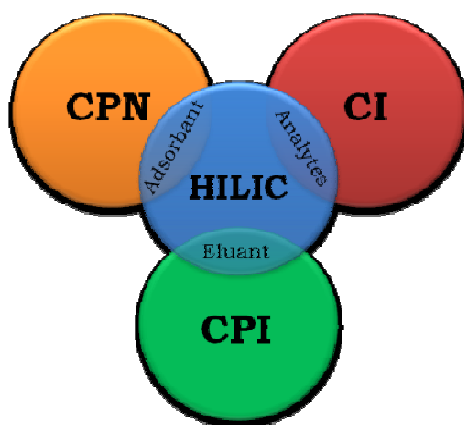


Figure 25 : Présentation de la chromatographie à interactions hydrophiles (HILIC).

En effet, la phase stationnaire est parfaitement adaptée à l'analyse et à la séparation de composés polaires avec une augmentation des temps de rétention lorsque la polarité augmente, de manière identique à ce que l'on observe classiquement en phase normale. La phase mobile (éluant) sera constituée d'un solvant organique polaire hydrophile (acétonitrile, méthanol, THF, etc...) en mélange binaire avec au moins 3% d'eau (tamponnée ou non) comme cela est coutumier en phase inverse. Enfin, le domaine d'application couvrira l'analyse des composés polaires ou ioniques, comme en phase ionique. De ce fait, cette méthode sera parfaitement adaptée à notre application dans laquelle on doit utiliser une élution polaire

hydrophile pour la séparation de composés polaires (acides phénoliques et dérivés, donneur de liaison hydrogène) ou ioniques (chlorure de cholinium).

2.1.3 : Alcoololyse du *p*-coumarate de méthyle dans ChCl:U et ChCl:Gly

En utilisant les conditions de séparation décrites précédemment, il a été possible de séparer et quantifier par spectroscopie UV-visible l'avancement de la réaction d'alcoololyse du *p*-coumarate de méthyle dans les différents MEP. La cinétique réactionnelle a ainsi pu être suivie sur 4 jours dans ces deux solvants. Cependant, presque aucune conversion (<2%), sans aucune formation du dérivé lipophile n'a été observée, quelles que soient les conditions réactionnelles.

Ce résultat inattendu ne pouvait pas s'expliquer par l'absence de solubilisation du substrat étant donné que le *p*-coumarate de méthyle était parfaitement dissous dans le MEP avant l'ajout du biocatalyseur. Les MEP présentent des propriétés de solvation qui sont fortement influencées par les liaisons hydrogène et se traduisent par une forte affinité avec les composés susceptibles de donner des électrons ou des protons. En d'autres termes, toute molécule capable de créer ce type de liaison sera sans aucun doute dissoute dans ces solvants. Dans le cas des composés phénoliques étudiés, ces molécules organiques ont un cycle aromatique substitué par différents groupes fonctionnels hydroxy ou méthoxy qui permettent l'établissement de plusieurs liaisons hydrogène intermoléculaires. De ce fait, leur solubilisation dans ce type de solvant n'a pas été un sujet de préoccupation. En outre, une éventuelle désactivation du biocatalyseur par le substrat peut être exclue. En effet, les expériences antérieures décrites dans la Littérature ont démontré et prouvé que ce substrat pouvait être raisonnablement converti en utilisant ce type de biocatalyseur (Stamatis *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2012).

Compte tenu de ce qui précède, il est probable que le *p*-coumarate de méthyle, dans le système que nous étudions, est également associé avec le réseau de liaisons hydrogène du MEP. Cependant, l'association est si forte qu'il est à peine disponible pour la réaction, comme on l'observe dans la plupart des cas avec le donneur de

liaison hydrogène. En effet, nous avons pu constater que la principale conséquence des fortes liaisons hydrogène entre le chlorure de cholinium et le glycérol ou l'urée, était la faible réactivité des composants et en particulier celle du donneur de liaison hydrogène (en tant que nucléophile compétitif). Par ailleurs, les études préliminaires concernant les extractions ont illustré combien il est difficile d'extraire à l'aide de solvants organiques (éther éthylique, acétate d'éthyle ou acétone) les composés polaires solubilisés dans un MEP, ce qui tend à renforcer l'hypothèse d'une forte association entre le substrat et le mélange. A partir de ces observations, nous avançons l'hypothèse selon laquelle l'ajout d'un co-solvant protique capable de créer des liaisons hydrogène plus facilement que le *p*-coumarate de méthyle, pourrait permettre de réduire l'interaction entre le MEP et ce substrat, le rendant plus disponible pour réagir. Parmi tous les candidats, l'eau nous a paru être l'un des meilleurs et ce pour deux raisons principales : d'une part, l'eau est sans doute l'un des meilleurs donneurs de liaisons hydrogène disponibles, et d'autre part elle permet de maintenir un système simple sans perdre de vue le côté « vert » des MEP. Il est également important de noter que l'eau a l'avantage de réduire fortement la viscosité de ces mélanges, permettant d'améliorer les transferts de masse, ces difficultés de transferts étant probablement l'une des principales faiblesses de ces milieux comme cela a été mentionné dans le chapitre précédemment et comme cela est d'ailleurs le cas pour la grande majorité des liquides ioniques conventionnels.

2.1.4 : Alcoololyse du *p*-coumarate de méthyle dans ChCl:U, en mélange avec de l'eau

Lorsque la réaction a été effectuée avec 2% (p/p) d'eau, une légère activité correspondant à 20% de conversion du substrat (après 72 h) avec formation du *p*-coumarate d'octyle a pu être observée (Figure 26).

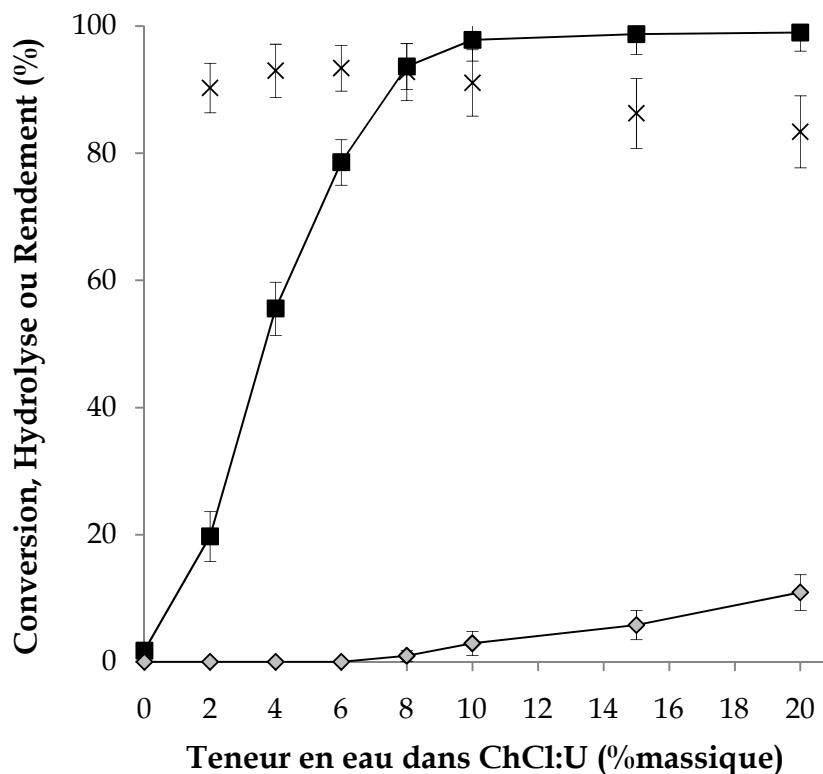


Figure 26: Alcoolyse du *p*-coumarate de méthyle avec le 1-octanol dans ChCl:U en mélange avec l'eau: Conversion (■), rendement (×) et hydrolyse (◆) en fonction de la teneur en eau après 72 h de temps de réaction (60°C, 40mM de *p*-coumarate de méthyle, 240mM de 1-octanol, 10 mg.ml⁻¹ iCALB). Les valeurs sont des moyennes issues de 2 répétitions.

Étonnamment, un ajout graduel d'eau dans le système, s'est traduit par une augmentation progressive et significative du taux de conversion. Pour des concentrations massiques en eau supérieures à 8%, une conversion quasi quantitative du substrat a été atteinte après seulement 72 heures de réaction. En outre, les expériences réalisées en l'absence de biocatalyseur n'ont abouti à aucune réactivité. Ces résultats montrent clairement que l'eau est essentielle à la réaction et que le mélange eutectique seul ne peut pas être utilisé pour catalyser spécifiquement cette réaction, comme cela a pu être observé dans certaines synthèses chimiques (Sonawane *et al.*, 2010; Azizi *et al.*, 2012e). Évidemment, la présence d'eau dans ce type de réaction peut entraîner une réaction d'hydrolyse compétitive et être défavorable pour l'équilibre de la réaction. Cependant, pour un temps de réaction

correspondant à l'équilibre apparent (72 h), aucune hydrolyse du *p*-coumarate de méthyle en acide *p*-coumarique n'a été mise en évidence pour des teneurs en eau inférieures à 6% (p/p) (Figure 26). Lorsque ces dernières sont comprises entre 8% et 10%, la production du *p*-coumarate d'octyle est maximale avec des taux de conversion compris entre 93% et 98%, alors que l'hydrolyse compétitive reste très faible (<2%). En parallèle, une expérience à l'échelle multi-grammes dans ChCl:U avec 10% de teneur massique en eau a été menée pour obtenir le composé phénolique lipophilisé en quantité élevée. La réaction a été réalisée en présence de 3 g de *p*-coumarate de méthyle (40mM) avec le 1-octanol dans un ratio molaire de 1:6 en utilisant 10mg/ml de biocatalyseur. Dans ces conditions, 97% de substrat ont été convertis après 72 h, avec un rendement de 93%, ce qui confirme la potentialité de cette synthèse en vue d'une application à plus grande échelle. Enfin, dans des mélanges contenant de plus grandes quantités d'eau (soit 15% et 20%), la réaction d'hydrolyse concurrentielle devient alors importante et conduit à une diminution des rendements (respectivement 86% et 83%). Par ailleurs, il est à noter que les baisses de rendements dans toutes ces réactions n'étaient pas uniquement dues à la seule hydrolyse, mais également à des réactions secondaires de dégradation à la fois du substrat et du produit.

En conclusion, l'efficacité de la réaction de lipophilisation du *p*-coumarate de méthyle passe indéniablement par l'ajout d'eau dans le milieu réactionnel. De ce fait, et comme le résume la Figure 27, différents équilibres réactionnels sont possibles. Il faut donc ajuster la quantité d'eau de telle façon qu'elle permette de favoriser la réaction d'alcoololyse tout en minimisant l'hydrolyse et la formation d'acide *p*-coumarique. Bien qu'il soit chimiquement possible d'obtenir le produit recherché en passant par la forme acide du substrat, les expériences ont révélé que l'estérification de l'acide phénolique était extrêmement faible dans ces conditions de réaction.

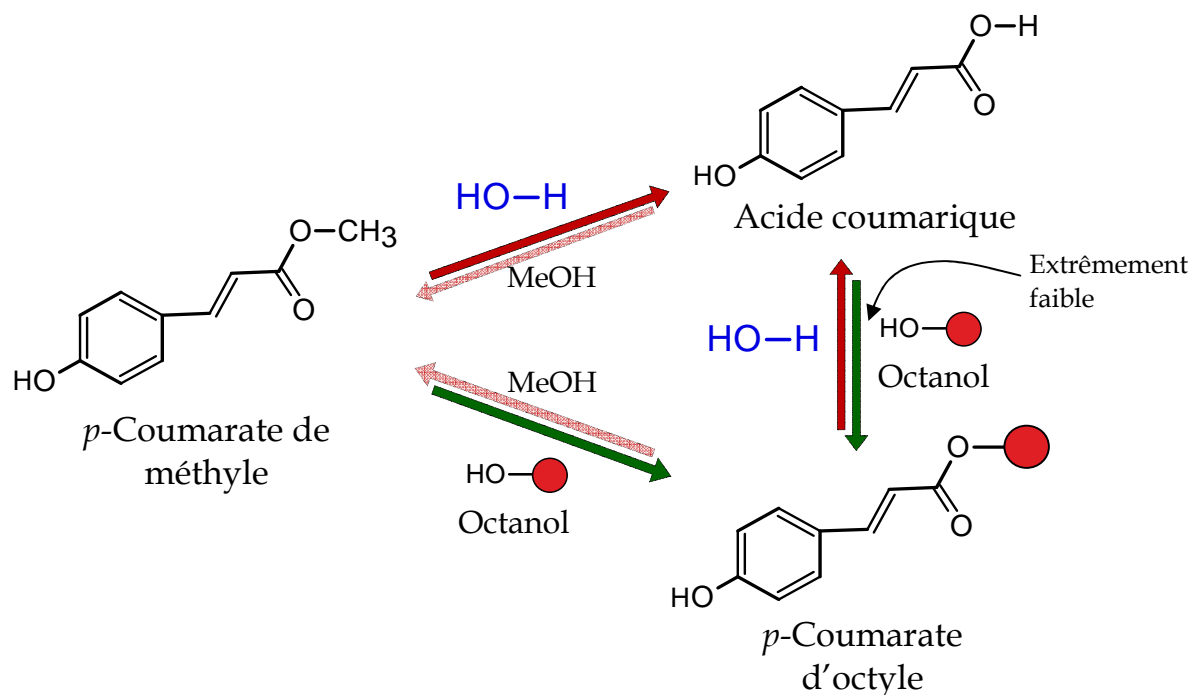


Figure 27 : Les différents équilibres thermodynamique lors de la réaction d'alkoolyse du *p*-coumarate de méthyle avec le 1-octanol dans ChCl:U en mélange avec l'eau.

2.1.5 : Alcoolse du *p*-coumarate de méthyle dans ChCl:Gly en mélange avec de l'eau

Lorsque la réaction a été effectuée dans le ChCl:Gly, le même phénomène a été observé, à savoir une faible activité dans le mélange eutectique pur suivi d'une augmentation de la conversion du *p*-coumarate de méthyle avec l'addition d'eau. Toutefois, contrairement aux expériences précédentes, la réaction s'est avérée beaucoup plus lente et aucun équilibre n'a été atteint après 725 h (30 jours), quelle que soit la teneur en eau. De plus, à ce temps de réaction, les taux de conversion ainsi que les rendements ont été bien inférieurs à ceux obtenus dans ChCl:U. En revanche, l'hydrolyse est restée à peu près équivalente quelle que soit la quantité d'eau mise en œuvre (Figure 28). Ainsi, la meilleure production en *p*-coumarate d'octyle (62%) a été obtenue avec la teneur en eau la plus élevée dans le système (20%) correspondant au taux de conversion le plus élevé. Toutefois, dans ces conditions, l'hydrolyse a atteint près de 10% ce qui explique la diminution du rendement de la réaction.

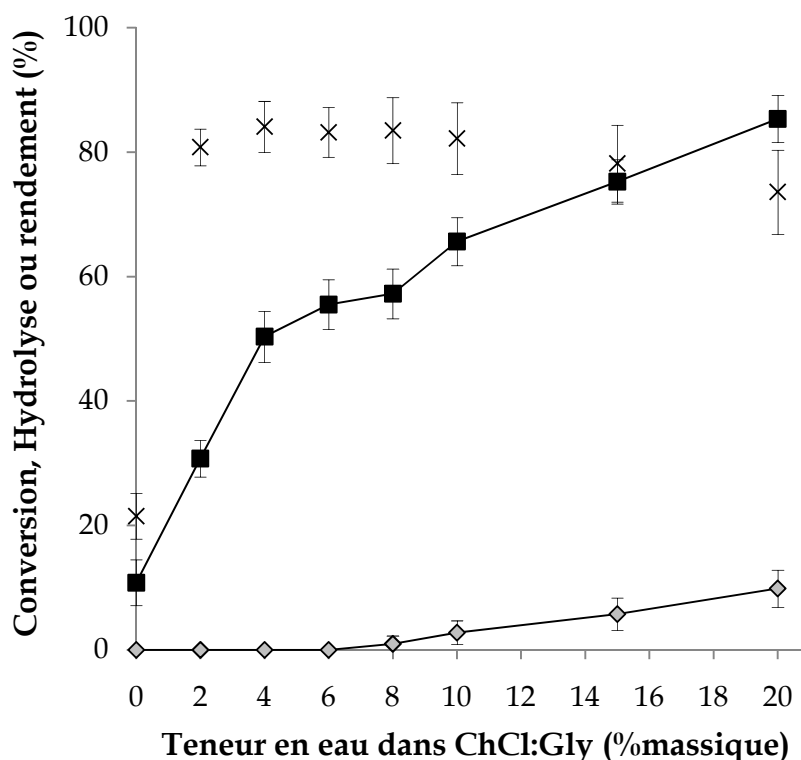


Figure 28 : Alcoololyse du *p*-coumarate de méthyle avec le 1-octanol dans ChCl:Gly en mélange avec l'eau: Conversion (■), rendement (×) et hydrolyse (◆) en fonction de la teneur en eau après 725 h de temps de réaction (60°C, 40mM de *p*-coumarate de méthyle, 240mM de 1-octanol, 10 mg.ml⁻¹ iCALB). Les valeurs sont des moyennes issues de 2 répétitions.

2.1.6 : Alcoololyse du férulate de méthyle dans ChCl:U et ChCl:Gly en mélange avec de l'eau

Afin de déterminer si ce procédé pouvait être étendu à d'autres substrats phénoliques, l'alcoololyse du férulate de méthyle (40mM) avec le 1-octanol (240mM) a été testée à 60°C. Une fois de plus, la présence d'eau dans le système a été nécessaire pour convertir le substrat (férulate de méthyle) en l'ester attendu (férulate d'octyle) (Figure 29). Comme précédemment, la réaction et les taux de conversions ont été plus élevés dans ChCl:U pour lequel l'équilibre apparent de la réaction a été atteint après 168 h. Toutefois, contrairement aux résultats observés avec le *p*-coumarate de méthyle, la réaction d'hydrolyse compétitive s'est avérée considérablement plus faible, et cela, quelle que soit la quantité d'eau employée (<2% d'hydrolyse avec 20% d'eau). Cette hydrolyse concurrentielle faible permet d'obtenir des rendements plus

élevés ($\geq 90\%$) pour des teneurs en eau plus fortes. Ainsi, même si la réactivité de l'eau semble être significativement réduite dans les mélanges MEP-eau, son activité nucléophile dans la réaction lipasique est difficilement prédictible car fonction de la nature du substrat utilisé.

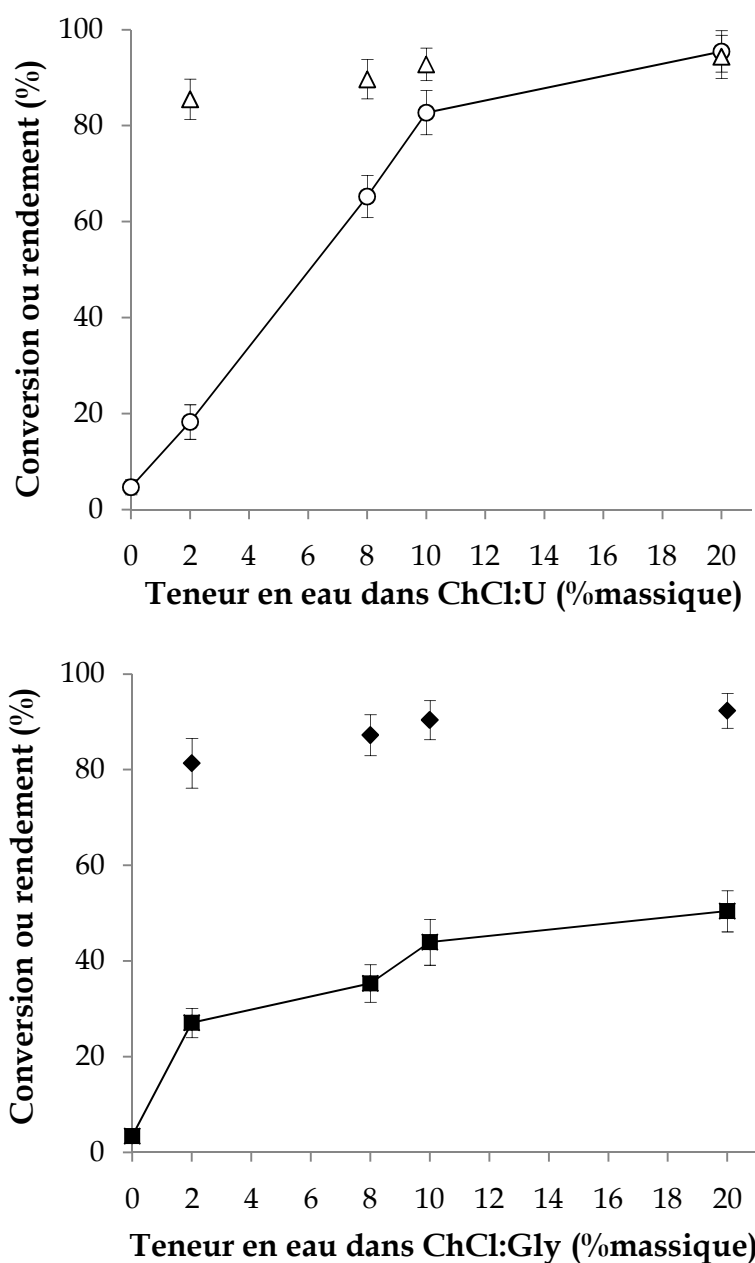


Figure 29 : Alcoololyse du férulate de méthyle avec le 1-octanol dans ChCl:Gly et ChCl:U en mélange avec de l'eau: Conversion (○) et rendement (△) dans ChCl:U après 168 h. Conversion (■) et rendement (◆) dans ChCl:Gly après 412 h. (60°C, 40mM de férulate de méthyle, 240mM de 1-octanol, 10 mg.ml⁻¹ iCALB). Les valeurs sont des moyennes issues de 2 répétitions.

2.1.7 : Conclusion sur l'alcoolyse des composés phénoliques dans les MEP

Ces résultats mettent en évidence plusieurs constats. Le premier est la très faible activité lipasique obtenue dans les MEP lorsqu'il s'agit de réaliser des réactions complexes pour lesquelles les substrats sont dissous dans le MEP. Dans ce cas, il est important de noter que l'aptitude qu'a un MEP à solubiliser des substrats polaires peut également être préjudiciable à leur disponibilité pour intervenir dans des réactions. Cependant, l'apport d'eau en grande quantité dans le milieu réactionnel permet d'accroître de façon considérable l'activité lipasique ce qui permet d'obtenir des taux de conversion pratiquement quantitatifs. *De facto*, l'eau apparaît comme étant indispensable à la réalisation de la catalyse enzymatique pour ce type de réaction. Malgré tout, ces résultats ne nous permettent pas de confirmer l'hypothèse précédemment avancée selon laquelle l'eau permettrait de diminuer les liaisons hydrogène établies entre le MEP et le substrat, rendant ce dernier plus disponible pour la réaction. En outre, ces résultats montrent que, malgré la présence d'un excès d'eau par rapport au 1-octanol (ratio molaire entre l'eau et le 1-octanol de 5,6 à 53,7), son activité nucléophile est sensiblement réduite dans le MEP, vraisemblablement en raison de sa plus forte implication (par rapport à l'alcool) dans le réseau de liaisons hydrogène.

Plusieurs études sur les propriétés physiques et thermodynamiques de mélange du type MEP-eau, ont mis en évidence une augmentation des liaisons hydrogène et l'établissement d'interactions plus fortes que dans le mélange eutectique pur. En effet, l'étude des capacités calorifiques (C_P : quantité d'énergie nécessaire pour élever de 1 degré une mole de substance) et du volume molaire (V_M : volume occupé par une mole d'une substance) des MEP en association avec de l'eau mettent en exergue une diminution du volume global qui pourrait être attribuée à l'augmentation des liaisons hydrogène qui s'établissent entre le MEP et l'eau (Leron *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012). De plus, selon Gutierrez *et al.* (Gutierrez *et al.*, 2009), une grande quantité d'eau correspondant à environ 50% (p/p) du mélange dans ChCl:U, est nécessaire pour briser le complexe supramoléculaire et obtenir une solution aqueuse simple de ces deux composants. Globalement, ces résultats renforcent l'idée que des liaisons

hydrogène fortes au sein de ces mélanges peuvent diminuer l'activité thermodynamique des molécules concernées.

Ces résultats révèlent également une meilleure activité catalytique de l'enzyme dans ChCl:U par rapport à ChCl:Gly. En conséquence, ChCl:U en mélange avec de l'eau apparaît comme un milieu réactionnel particulièrement intéressant car biodégradable, facile à synthétiser, sans danger, ni toxicité et hautement efficace pour réaliser des modifications enzymatiques de molécules d'intérêt.

Après avoir fait l'observation que l'eau était indispensable à la réussite de la réaction lipasique dans ces solvants, nous allons à présent examiner la façon dont l'eau dans le système peut influencer directement l'activité enzymatique. Les molécules d'eau peuvent interagir avec les résidus chargés et polaires des protéines et, de cette manière, contribuent à leur activité et leur stabilité. De par leur association au travers de liaisons hydrogène, les molécules d'eau permettent d'obtenir la conformation spatiale opérationnelle de l'enzyme indispensable à sa bonne activité. Elle affecte la polarité du site actif, la souplesse de la protéine ainsi que l'équilibre thermodynamique de la réaction. Toutefois, dans le cas particulier des réactions d'alcoolyse avec une lipase, l'eau peut aussi agir comme un substrat nucléophile concurrentiel. Par conséquent, le contrôle de la présence de l'eau est capital car elle peut avoir un effet néfaste sur la cinétique et le rendement de la réaction. En d'autres termes, si la teneur en eau est trop faible, la protéine risque d'être trop peu « flexible » ce qui conduit à une faible activité. A l'inverse, un excès de molécules d'eau à proximité du site actif peut engendrer une réaction d'hydrolyse compétitive, mais peut également constituer une barrière diffusionnelle pour les substrats hydrophobes. De ce fait, il est extrêmement important de contrôler la teneur en eau afin de déterminer les conditions réactionnelles optimales de l'alcoolyse. Pour cela, nous allons étudier plusieurs paramètres essentiels dans les réactions catalysées par la lipase, tels que l'activité thermodynamique de l'eau (a_w), le pH des milieux réactionnels ainsi que la stabilité de iCALB.

2.2 : Effet de la teneur en eau sur les propriétés fonctionnelles du milieu réactionnel

2.2.1 : Effet de la teneur en eau sur l'activité thermodynamique (a_w) du milieu réactionnel

Il est bien connu que l'activité catalytique est très sensible à l'état d'hydratation de l'enzyme qui est essentiellement régie par a_w dans le système. En effet, il n'est pas rare de remarquer que dans le domaine de la biocatalyse, a_w est souvent responsable de changements dans l'activité optimale du biocatalyseur sans qu'aucun autre aspect du système ne soit changé. Pour cette raison, a_w a été mesurée dans les deux MEP ChCl:U et ChCl:Gly. Les résultats révèlent une augmentation strictement proportionnelle de a_w en fonction de la teneur en eau (P%) du système, comme l'indiquent les relations linéaires suivantes :

$$a_w (\text{ChCl:U}) = 0.0183 \text{ P\%} + 0,0204, R^2 = 0,996$$

$$a_w (\text{ChCl:Gly}) = 0.0183 \text{ P\%} + 0,0425, R^2 = 0,993$$

Où a_w (CHCl:U) représente l'activité thermodynamique de l'eau dans ChCl:U, a_w (ChCl:Gly) représente l'activité thermodynamique de l'eau dans ChCl:Gly.

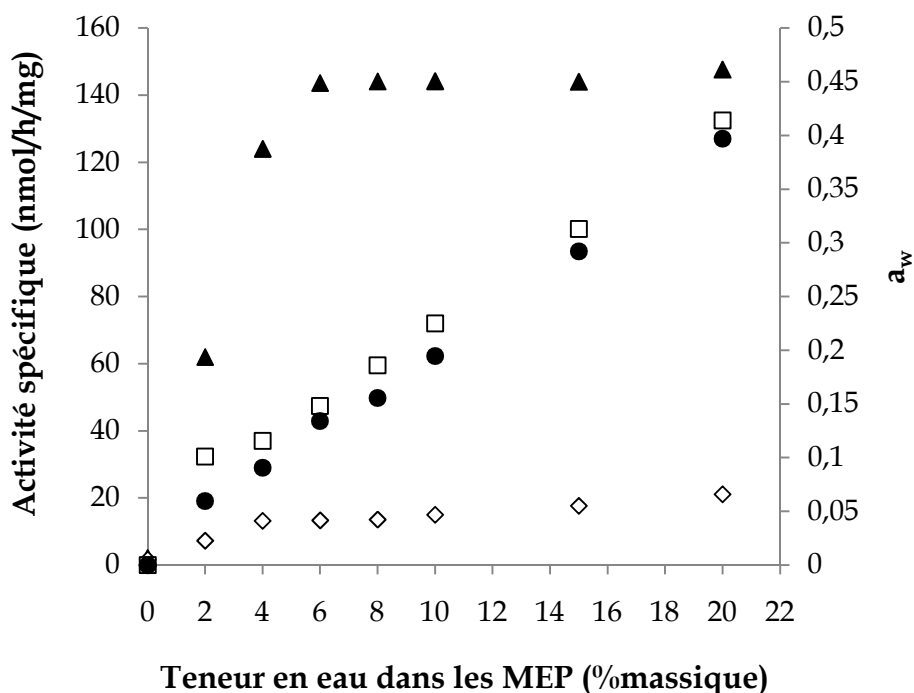


Figure 30: Activité thermodynamique de l'eau (a_w) et activité spécifique de la lipase (correspond à la quantité de substrat transformée par heure et par mg d'enzyme à 60°C) en fonction de la teneur en eau dans ChCl:Gly ou ChCl:U. Activité spécifique dans ChCl:Gly (◇) et dans ChCl:U (▲), a_w ChCl:Gly (□) et a_w ChCl:U (●). Les valeurs sont des moyennes de 2 répétitions.

Il faut remarquer que la valeur de la pente est identique dans les deux cas, ce qui indique que le chlorure de cholinium est sans doute l'élément déterminant pour contrôler ce paramètre.

Comme l'indique la Figure 30, dans le MEP à base d'urée, une augmentation significative de l'activité enzymatique spécifique est observée lorsque la teneur en eau augmente jusqu'à 6%, teneur en eau correspondant à une a_w de l'ordre de 0,15. En effet, la vitesse de réaction dans le ChCl:U en mélange avec 6% d'eau ($a_w \approx 0,15$) est deux fois plus rapide pour atteindre l'équilibre apparent que dans le ChCl avec 2% d'eau ($a_w = 0,06$). En outre, presque aucune différence dans l'activité spécifique n'est observée pour des teneurs en eau supérieures à 6%.

Dans ChCl:Gly, une augmentation légère et progressive de l'activité spécifique de la lipase est observée lorsque la teneur en eau croît jusqu'à 20%. A ce stade, la cinétique réactionnelle est trois fois plus rapide que dans le MEP avec 2% d'eau.

Ce résultat confirme l'importance du réseau de liaisons hydrogène existant entre les molécules d'eau et le MEP, ce qui pourrait dans ce cas expliquer sa très faible activité nucléophile. En effet, l' a_w reste relativement faible par rapport à la quantité d'eau ajoutée dans le système. Il faut noter que pour des concentrations massiques en eau inférieures à 6% ($a_w < 0,15$), son activité nucléophile est particulièrement réduite puisqu'aucune activité hydrolytique n'est constatée. Par ailleurs, l'état de très faible hydratation de la lipase dans un MEP pur ou très faiblement hydraté, pourrait expliquer les difficultés rencontrées pour réaliser ce type de réaction. Enfin, malgré une amélioration significative de l'activité spécifique de l'enzyme lorsque l' a_w croît jusqu'à 0,15, on ne peut pas déduire pour autant que cette valeur correspond à l' a_w optimale.

2.2.2 : Effet de la teneur en eau sur le pH du milieu réactionnel

Il est important de vérifier si l'ajout d'une grande quantité d'eau dans le milieu a une influence notable sur le pH ce qui pourrait expliquer les résultats sensiblement différents sur l'activité de la lipase. L'évolution du pH en fonction de la teneur en eau dans les mélanges du type MEP-eau est représentée sur la Figure 31. Compte tenu des difficultés rencontrées pour évaluer le pH par la méthode électrochimique traditionnelle avec un pH-mètre en solutions non aqueuses ou très légèrement hydratées, le pH des MEP ayant une teneur en eau inférieure à 4% n'a pas été pris en compte.

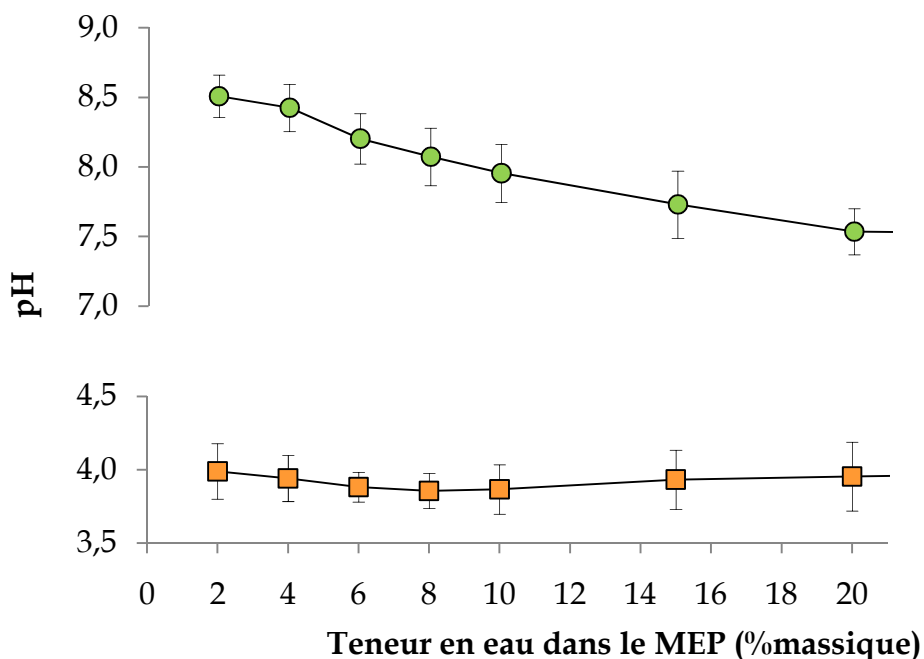


Figure 31 : pH mesuré dans ChCl:Gly (■) et ChCl:U (●) en mélange avec de l'eau. Les valeurs sont des moyennes de 3 répétitions.

Les résultats montrent que l'ajout d'eau n'a que peu d'influence sur la variation du pH, quel que soit le MEP. Dans ChCl:U, une unité de pH est perdue (de 8,5 à 7,5) lorsque la teneur en eau augmente jusqu'à 20%. Dans ChCl:Gly, le pH de solutions hydratées avec indifféremment 4% ou 20% de concentration massique en eau est identique, alors que dans ces deux milieux, les activités biocatalytiques sont très différentes. En conséquence, le pH seul ne peut pas expliquer la variation et l'augmentation importantes dans l'activité enzymatique lorsque de l'eau est ajoutée à un MEP. Néanmoins, le pH peut favoriser l'activité lipasique ce qui pourrait expliquer les meilleures performances en terme de cinétique réactionnelle dans ChCl:U. En effet, dans ce solvant, les pH sont assez proches des conditions réactionnelles optimales de iCALB (pH entre 7 et 8), alors que les pH plus acides (entre 3.5 et 4) observés dans ChCl:Gly semblent être plus défavorables.

Afin de mieux comprendre les rôles respectifs du pH et de l'eau sur l'activité de l'enzyme, des expériences supplémentaires dans les mêmes conditions ont été réalisées dans des MEP à base de chlorure de cholinium et de deux dérivés de l'urée ; à savoir la N-méthyle urée (MeU) et l'acétamide (Acet) (Figure 32).

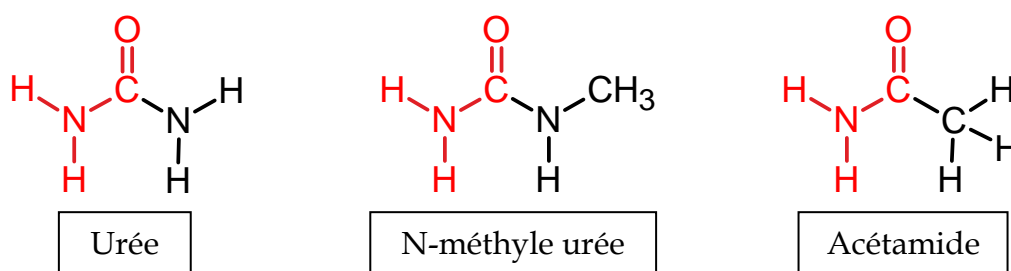


Figure 32 : Formules développées de l'urée (U) et de ses deux dérivés, la N-méthyle urée (MeU) et l'acétamide (Acet).

Ces MEP devraient avoir un pH relativement proche de celui du ChCl:U mais avec vraisemblablement des propriétés de solvation différentes. En effet, la substitution d'un groupe -NH_2 de l'urée par -NHCH_3 (MeU) ou -CH_3 (Acet), entraîne incontestablement un changement à la fois dans la polarité du DLH mais aussi dans le réseau de liaisons hydrogène du MEP.

Dans les mélanges ChCl:MeU ou ChCl:Acet contenant moins de 8% d'eau, aucune activité enzymatique n'a pu être détectée (Tableau 24), en dépit d'un pH (7,11 à 7,64) proche des conditions optimales pour iCALB. En outre, la teneur en eau doit être amenée à 20% pour obtenir une légère activité enzymatique.

Ces résultats montrent qu'en présence d'eau, la nature du donneur de liaison hydrogène, et non pas le pH, est probablement le principal facteur qui détermine cette différence d'activité. Dans ces mélanges aqueux, les propriétés physico-chimiques du donneur de liaison hydrogène ont un impact direct sur la réactivité du substrat et l'activité du biocatalyseur. En conclusion, la nature du DLH et l'ajout d'eau apparaissent comme les deux paramètres essentiels qui conditionnent l'efficacité de la biotransformation.

	Teneur en eau (% massique)	pH	Activité spécifique (nmol/h/mg)	Conversion (%)
ChCl:U (1:2, T_f=12°C)	0	-	Aucune activité significative	
	4	8.43	124	53 (72h)
	8	8.07	144	94 (72h)
	20	7.54	147	99 (72h)
ChCl:MeU (1:2, T_f=29°C)	0	-	Aucune activité significative	
	8	7.64		
	20	6.52	7	9 (120h)
	25	6.36	14	16 (120h)
ChCl:Acet (1:2, T_f=51°C)	0	-	Aucune activité significative	
	8	7.11		
	20	6.34	Très faible	2 (120h)
	25	6.11	<0,5	5 (120h)

Tableau 24 : pH et activités spécifiques enzymatiques dans les MEP ChCl:U, ChCl:MeU et ChCl:Acet avec différentes quantités d'eau.

2.2.3 : Effet de la teneur en eau sur l'activité résiduelle de la lipase

Nous pouvons considérer que le fait d'ajouter différentes quantités d'eau dans le mélange peut changer de façon significative la stabilité de l'enzyme. Pour évaluer l'activité résiduelle de iCALB, celle-ci a été incubée pendant plusieurs jours à 60 °C dans les différents milieux (MEP-eau) avant de déterminer son activité spécifique dans la réaction d'alcoolyse du *p*-coumarate de méthyle (40mM) avec le 1-octanol (240mM).

Comme le montre la Figure 33, les temps de demi-vie de l'enzyme (la demi-vie est définie comme étant le temps nécessaire pour que l'activité résiduelle soit diminuée de 50% par rapport à sa valeur initiale) augmentent de façon spectaculaire avec la teneur en eau, quel que soit le MEP sélectionné. En d'autres termes, plus la teneur en eau est grande, plus la stabilité du catalyseur est élevée.

Par exemple, l'augmentation de la teneur en eau de 2% à 20% dans le ChCl:U a permis de multiplier par dix l'activité résiduelle de la lipase, avec un temps de demi-vie évoluant favorablement de 1 à 11 jours. Ainsi, dans des mélanges avec de faibles teneurs en eau, l'activité résiduelle est sensiblement réduite, ce qui pourrait expliquer les faibles taux de conversion observés et l'équilibre apparent obtenu prématurément dans ces conditions après seulement quelques heures de réaction.

D'autre part, iCALB s'est avérée être beaucoup plus stable dans le ChCl:Gly en mélange avec l'eau pour lesquels les temps de demi-vie sont beaucoup plus élevés (de 10 jours à plus de 45 jours) quelle que soit la teneur en eau. Par conséquent, les activités résiduelles de la lipase pour des réactions d'alcoolyse de composés phénoliques tel que le *p*-coumarate de méthyle dans un MEP à base de glycérol, ont été plus élevées que pour un MEP à base d'urée.

Tous ces résultats concernant la stabilité de iCALB dans les MEP ChCl:U et ChCl:Gly viennent corroborer nos précédentes observations et interprétations à propos de l'effet beaucoup moins dénaturant du glycérol vis-à-vis de l'enzyme (§ 1.1.3).

En définitive, la nature du donneur de liaison hydrogène joue un rôle important dans la conformation, l'état mais aussi la stabilité de la lipase. Cependant, quel que soit le MEP mis en jeu, l'augmentation de la teneur en eau préserve l'activité catalytique de l'enzyme pour la réaction spécifique testée.

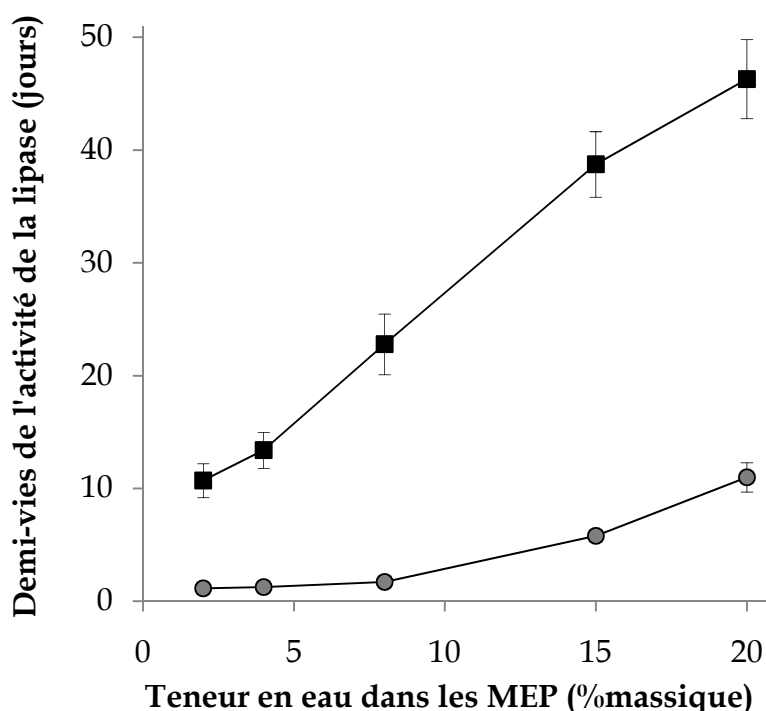


Figure 33 : Temps de demi-vie de iCALB (jours) mesuré sur l'alkoolyse du *p*-coumarate de méthyle (40 mM) par le 1-octanol (240 mM) à 60°C (ratio 1:6) dans ChCl:Gly (■) et CHCl:U (●) en mélange avec de l'eau. Les valeurs sont des moyennes de 3 répétitions.

2.2.4 : Conclusions sur l'effet de la teneur en eau dans le milieu réactionnel

Nos résultats montrent que les réactions avec des substrats dissous (tels que les composés phénoliques) catalysées par la lipase en MEP, sont extrêmement difficiles à réaliser sans addition d'eau. La très faible activité de la lipase iCALB dans les MEP purs ou très faiblement hydratés, pourrait s'expliquer par la forte association entre le substrat et le réseau de liaisons hydrogène associé à une très faible activité thermodynamique de l'eau. En ce sens, nous avons montré que l'ajout de grandes quantités d'eau dans ces milieux peut conduire à une augmentation significative de l'activité catalytique. Bien que les réactions aient été effectuées avec de fortes quantités d'eau, les activités thermodynamiques sont restées faibles, ce qui peut expliquer la faible activité hydrolytique dans ces systèmes. L'explication la plus plausible réside dans la formation de complexes intermoléculaires entre le MEP et l'eau, impliquant de très fortes interactions par liaisons hydrogène. Ainsi, l'ajout

d'une grande quantité d'eau dans un mélange eutectique profond a eu de nombreux avantages :

- (i) diminution apparente de la viscosité ce qui conduit à une amélioration significative du transfert de masse;
- (ii) augmentation significative de l'activité spécifique de la lipase et des taux de conversions finaux
- (iii) maintien de l'activité catalytique de l'enzyme.

En ce qui concerne les valeurs de pH dans ces MEP hydratés, l'état acide ou basique dépend de la nature du donneur de liaison hydrogène. De plus, l'ajout d'eau ne provoque pas de variations significatives des valeurs. Le rôle secondaire joué par le pH sur l'activité catalytique de la lipase a été confirmé par les résultats sensiblement différents obtenus entre des MEP basés sur des donneurs de liaison hydrogène de nature chimique analogue ayant des valeurs de pH comparables. Ainsi, le donneur de liaison hydrogène semble être essentiel, et permet, une fois combiné avec l'eau, de contribuer grandement aux succès de la réaction.

De ce fait, il serait intéressant de pouvoir tester et comparer l'activité biocatalytique sur ces systèmes hydratés, en utilisant différents types de donneurs de liaison hydrogène combinés au chlorure de cholinium. Toutefois, d'autres recherches sont nécessaires afin que ce système très simple, efficace et attractif (faible coût, faible toxicité, faible dangerosité, biodégradable et facile à préparer avec 100% économie d'atomes) puisse être appliqué à la modification de substrats polaires.

2.3 : Alcoolyse du *p*-coumarate de méthyle avec le 1-octanol biocatalysée par iCALB dans différents mélanges MEP-eau

En conséquence des observations précédentes, nous avons décidé de tester différents types de donneurs de liaisons hydrogène, qui, en association avec le chlorure de cholinium, permettent d'obtenir des MEP ayant des températures de fusion inférieures à 60°C. En effet, nos réactions étant réalisées à 60°C, il va de soi que

le MEP sélectionné devra avoir une température de fusion inférieure à cette température pour être utilisé à l'état liquide. Il est également important de garder à l'esprit que la température de fusion d'un MEP ne conditionne pas sa viscosité. En d'autres termes, un MEP ayant un point de fusion de 30°C ne sera pas forcément plus visqueux à cette température, qu'un MEP ayant une température de fusion de 20°C.

La Figure 34 représente l'ensemble des donneurs de liaison hydrogène utilisés pour la synthèse de MEP à base de chlorure de cholinium (ChCl).

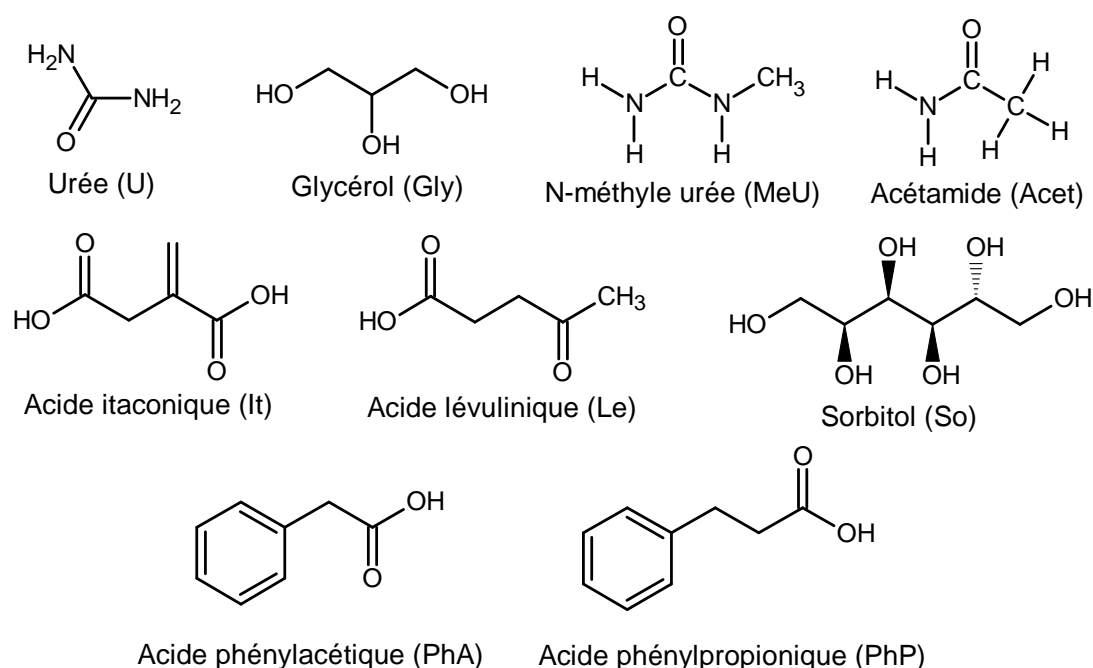


Figure 34 : Les différents donneurs de liaison hydrogène utilisés dans la synthèse de MEP à base de chlorure de cholinium (ChCl).

Le Tableau 25 ci-après résume tous les mélanges eutectiques (en association ou non avec de l'eau) qui ont été testés dans l'alcoololyse du *p*-coumarate de méthyle avec le 1-octanol en utilisant iCALB comme biocatalyseur. Les températures de fusion du mélange et les ratios molaires à l'eutectique (décrit dans la littérature) y sont également indiqués.

	% massique en eau	Activité spécifique nmol/h/mg	Conversion (%)	Rendement d'hydrolyse (%)
ChCl:U (1:2, Tf=12°C)	0	Aucune activité significative		
	4	124	54 (72h)	0
	8	144	94 (72h)	1
	20	147	99 (72h)	11
ChCl:Gly (1:2, Tf<20°C)	0	Aucune activité significative		
	4	13	50 (725h)	0
	8	13	57 (725h)	2
	20	21	85 (725h)	11
ChCl:MeU (1:2, Tf=29°C)	0	Aucune activité significative		
	8			
	20	7	9 (120h)	24
	25	14	16 (120h)	38
ChCl:Acet (1:2, Tf=51°C)	0	Aucune activité significative		
	8			
	20	Très faible	2 (120h)	<1
	25	<0,5	5 (120h)	18
ChCl:Le (1:2, Tf=RT)	0	Aucune activité significative		
	4			
	8			
	20			
ChCl:It (1:1, Tf=57°C)	0	Aucune activité significative		
	4			
	8			
	20	Très faible	5 (456h)	21
ChCl:So (1:1, Tf=RT)	0	Aucune activité significative		
	4	10	40 (456h)	0
	8	14	61 (456h)	4
	20	29	96 (456h)	15
ChCl:PhA (1:1, Tf=25°C)	0	Aucune activité significative		
	4			
	8			
	20	Très faible	<2 (468h)	<0.5
ChCl:PhP (1:1, Tf=20°C)	0	Aucune activité significative		
	4			
	8			
	20			

Tableau 25 : Activités spécifiques de iCALB (10mg/ml) dans différents MEP en association (ou non) avec de l'eau, dans l'alkoolyse du *p*-coumarate de méthyle avec le 1-octanol à 60°C (ratio 1 :6).

La très forte disparité dans les activités spécifiques et l'avancement des réactions mettent indéniablement en valeur l'effet prépondérant du donneur de liaison hydrogène et l'influence positive de l'eau sur les réactions, quel que soit le MEP. Au vu des résultats, trois MEP semblent particulièrement intéressants : ChCl:U, ChCl:Gly et ChCl:So.

Même s'il apparaît très difficile d'établir une relation entre nature du DLH et activité enzymatique, il semblerait que plus la polarité du DLH est forte, meilleure est l'activité. En effet, ces résultats peuvent laisser penser que plus grande sera la valeur du ratio $\frac{\text{Nombre de liaison hydrogène potentielle du DLH}}{(\text{Taille} \times \text{volume}) \text{ du DLH}}$, meilleure sera l'activité enzymatique. En ce sens, l'urée se révèle être un candidat de choix au même titre que les polyols tels que le glycérol ou le sorbitol. Cependant, l'urée en combinaison avec le ChCl (en association avec de l'eau) s'affirme bel et bien comme le solvant le plus efficace pour la réalisation de ce type de biotransformation.

2.4 : Alcoolyse du *p*-coumarate de méthyle avec le 1-octanol, biocatalysée par différentes lipases commerciales, dans ChCl:U en association avec de l'eau

Plusieurs lipases commerciales ont été testées dans la réaction d'alcoolyse du *p*-coumarate de méthyle avec le 1-octanol en conservant les mêmes conditions opératoires. L'objectif n'a pas été de comparer leurs activités dans les MEP mais simplement de discerner une activité biocatalytique. De fait, il n'a pas été nécessaire de normaliser à un nombre d'unité d'activité les différentes lipases commerciales. Le milieu réactionnel utilisé est le MEP ChCl:U, pur ou en mélange avec 8 ou 20% d'eau (p/p). Les lipases se différencient par leurs sources mais aussi et surtout par leurs formulations puisque certaines d'entre elles sont immobilisées sur des supports de nature différente et de taille pouvant être variable.

Les résultats révèlent clairement que, hormis la lipase B de *Candida antarctica* (sous sa forme immobilisée ou native), aucune autre enzyme n'est active dans ce type de solvant (Tableau 26). L'absence d'activité catalytique chez les autres lipases est très difficile à expliquer. Une désactivation précoce, une mauvaise dynamique de la protéine (mobilité et conformation) ou encore un problème conformationnel du site actif peuvent être envisagées.

Malgré tout, ces résultats mettent une nouvelle fois de plus en exergue la robustesse et l'efficacité catalytique de la lipase B de *Candida antarctica*.

Alcoololyse du du <i>p</i> -coumarate de méthyle avec le 1-octanol			
Lipases (granulométrie)	Conversion (%) dans ChCl:U	Conversion (%) dans ChCl:U et eau 8% (p/p)	Conversion (%) dans ChCl:U et eau 20% (p/p)
Lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (0.15-0.3mm).	aucune	aucune	aucune
Lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i> (0.15-0.3mm).	aucune	aucune	aucune
Lipase de <i>Candida rugosa</i> (0.15-0.3mm).	aucune	aucune	aucune
Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (0.15-0.3mm).	aucune	aucune	aucune
Lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> (0.15-0.3mm).	aucune	aucune	aucune
Lipozyme de <i>Mucor Miehei</i> , RMIM (0.2-0.6mm).	aucune	aucune	aucune
Amano lipase M, de <i>Mucor javanicus</i>	aucune	aucune	aucune
Amano lipase PS, de <i>Burkholderia cepacia</i>	aucune	aucune	aucune
Amano lipase A, d' <i>Aspergillus niger</i>	aucune	aucune	aucune
Lipase B de <i>Candida antarctica</i>	aucune	55 (72h)	82 (72h)

Tableau 26 : Activité de différentes lipases commerciales dans ChCl:U en association (ou non) avec de l'eau dans la réaction d'alcoololyse du *p*-coumarate de méthyle avec le 1-octanol (1:6) à 60°C après 72 heures.

D'autre part, si l'on compare les résultats de biocatalyse de la lipase B de *Candida antarctica*, sous sa forme native ou immobilisée sur un support acrylique macroporeux (Novozym435), nous pouvons constater le même effet positif de l'eau sur le taux de conversion du *p*-coumarate de méthyle (Figure 35).

De ce fait, nous pouvons confirmer le fait que le support n'est pas le facteur déterminant, qui viendrait expliquer l'augmentation progressive des taux de conversion en fonction de l'ajout progressif d'eau. Ces valeurs, obtenues à l'équilibre apparent de la réaction constaté après 72 heures de réaction, mettent en évidence une *quasi* similitude des résultats pour les taux d'hydrolyse et les rendements de réaction. En revanche, de meilleurs taux de conversion sont obtenus avec la lipase sous sa forme immobilisée (Novozym435). La quantité d'enzyme utilisée pour catalyser la réaction a été normalisée en fonction de la teneur en protéine et une bien meilleure production du dérivé lipophile est obtenue avec l'enzyme sous sa forme immobilisée. Nous pensons que cette différence est principalement due à une meilleure stabilité de la lipase sous sa forme immobilisée ce qui expliquerait les taux de conversion différents mais des rendements d'hydrolyses et d'alcoolyses similaires.

En conclusion, que ce soit d'un point de vue économique ou catalytique, la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée (Novozym435) apparaît une enzyme de tout premier choix pour la réalisation de biotransformation en MEP.

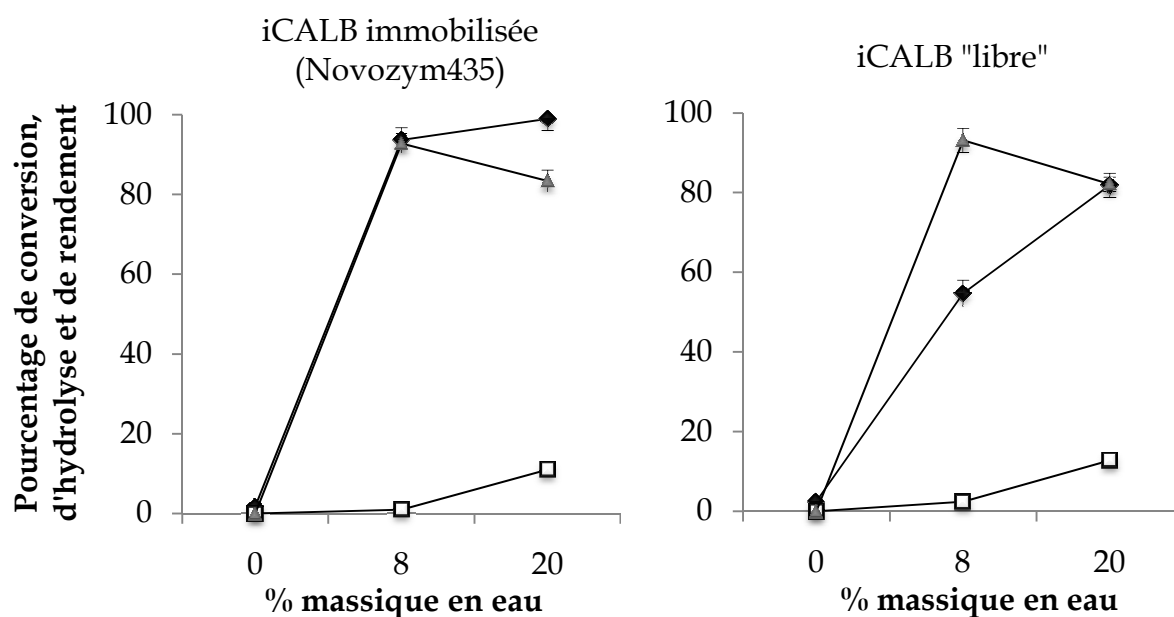


Figure 35 : Conversion ◆, hydrolyse □, et rendement ▲ lors de l'alcoololyse du *p*-coumarate de méthyle avec le 1-octanol (1:6) à 60°C dans ChCl:U en association (ou non) avec de l'eau biocatalysé par iCALB sous sa forme native ou immobilisée après 72 heures.

A présent, l'enjeu de l'étude va être d'essayer de comprendre d'un point de vue fondamental l'organisation supramoléculaire de ce type de milieux pour déterminer les paramètres qui influencent le plus la réactivité enzymatique dans ce type d'environnement.

Comme le chlorure de cholinium en association avec l'urée et de l'eau a donné d'excellents résultats dans les réactions de lipophilisation de composés phénoliques en présence d'iCALB, nous avons décidé de poursuivre notre étude avec ce système réactionnel modèle.

Partie 3. Compréhension de l'organisation du mélange ternaire ChCl:Eau:U, en vue de l'optimisation des conditions de lipophilisation par la lipase B de *Candida antarctica* (iCALB)

3.1. Contexte

Nous avons depuis le départ de l'étude, mis en lumière des résultats très encourageants quant à la synthèse enzymatique en MEP. En particulier, il a été démontré que les MEP à base de ChCl (ChCl:Gly ou ChCl:U) en mélange avec l'eau (indispensable à l'activité enzymatique), peuvent être utilisés efficacement pour l'alcoolyse d'esters phénoliques avec le 1-octanol, en utilisant la lipase B immobilisée de *Candida antarctica* (iCALB) comme biocatalyseur. Les meilleurs résultats ayant été obtenus dans les mélanges ChCl:U-Eau (8 à 20%, p/p), c'est avec ce type de milieu que nous avons décidé de poursuivre notre étude.

ChCl:U est connu pour former un réseau de liaisons hydrogène fort, entraînant une sévère baisse de l'activité thermodynamique de ses composants. Par ailleurs, plusieurs études sur le mélange ChCl:Eau:U ont mis en évidence une augmentation de ces liaisons hydrogène et l'établissement d'interactions plus fortes que dans ChCl:U pur (Leron *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012). Par conséquent, ce type de mélange est formé de trois composantes fortement liées pour lesquelles les liaisons hydrogène constituent les principales forces d'interactions. Cependant, il est difficile de prédire comment les molécules impliquées dans ce réseau sont organisées. Il est tout aussi difficile de prédire leur influence respective sur les propriétés fonctionnelles du milieu, en particulier dans les réactions catalysées par les lipases.

Aussi, dans l'optique d'élargir le champ d'application de ces solvants « verts », nous avons tenté de comprendre comment est structuré ce milieu réactionnel et quelle est l'influence de chacun de ses constituants (ChCl, urée, eau) sur les réactions mises en jeu dans ce solvant. Par ailleurs, dans le cas de la catalyse lipasique, nous avons tenté

d'expliquer les différences d'activité et de stabilité de l'enzyme ainsi que le comportement des substrats dans ce type d'environnement. Par conséquent, ce chapitre a visé à fournir des informations précieuses sur la structure de ces mélanges à base de ce sel de cholinium.

3.2. : Mesure de l'activité thermodynamique et intensité de vibration de flexion de l'eau associée au chlorure de cholinium

Nous avons choisi de baser notre étude structurale sur l'activité thermodynamique de l'eau (a_w) dans différentes solutions aqueuses de chlorure de cholinium (ChCl). Ce paramètre devrait nous renseigner sur l'intensité globale avec laquelle l'eau est associée au ChCl et sur ses propriétés fonctionnelles dans l'environnement (réactivité, hydratation de l'enzyme). D'un point de vue expérimental, les mesures d' a_w ont été effectuées sur un mélange constitué d'une mole de ChCl, associé à une quantité croissante d'eau.

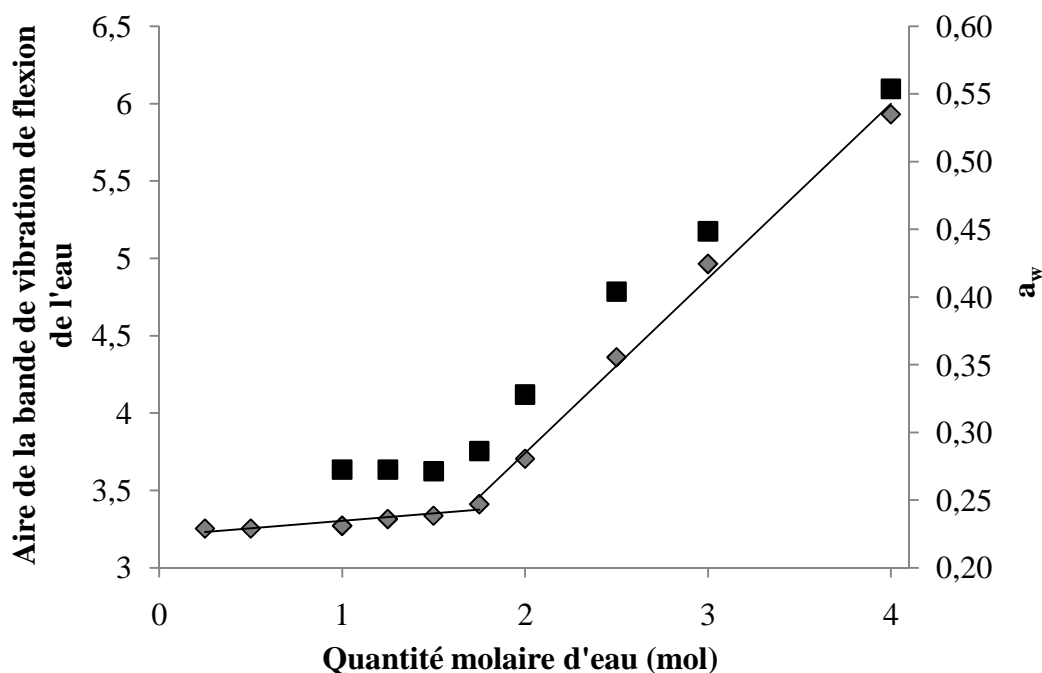


Figure 36 : Activité thermodynamique (♦) et intensité de la vibration de flexion de l'eau (■) associée à une mole de ChCl. L'aire a été mesurée à partir du pic de vibration de flexion de l'eau à 1630 cm^{-1} en utilisant la spectroscopie IR-TF.

Concernant l' a_w , les résultats (Figure 36) dévoilent clairement deux sections linéaires séparées par un point d'inflexion très marqué. En effet, dans la première partie linéaire (de 0 à 1,75 mole d'eau), qui correspond à la saturation du ChCl par les molécules d'eau, l' a_w reste pratiquement constante (a_w de 0,23 à 0,24). Il est à noter que ces valeurs sont relativement faibles, ce qui signifie que les molécules d'eau sont fortement liées au sel. Dans la deuxième partie linéaire on observe une augmentation de l' a_w proportionnelle à la quantité d'eau additionnée. Cela signifie que la limite a été atteinte entre l'eau qui est fortement liée au sel et l'eau de solvation. Ainsi, à partir de ce ratio, chaque molécule d'eau ajoutée au mélange va sensiblement augmenter sa disponibilité. La réactivité nucléophile de l'eau et son influence sur la structure de la lipase devraient alors être considérablement augmentées.

Pour mettre en évidence cette très forte association entre l'eau et le ChCl, des expériences parallèles ont été conduites en utilisant la spectroscopie IR-TF. L'eau a trois principaux modes de vibration: élongation symétrique, élongation asymétrique et flexion. La bande de vibration de flexion de la molécule d'eau est centrée sur un nombre d'onde de 1630 cm^{-1} . L'intensité des bandes d'absorption dans le spectre IR dépend de la variation du moment dipolaire, qui lui-même dépend de la longueur de la liaison et de la différence de charge entre les deux atomes. De plus, le nombre de liaisons concernées par la vibration spécifique aura également un impact sur l'intensité.

L'intensité de vibration de flexion de la molécule d'eau (Figure 36) est représentée par l'aire du pic de vibration à 1630 cm^{-1} . Les résultats démontrent que l'intensité de la vibration de l'eau suit un comportement similaire à son activité thermodynamique, avec deux zones de linéarité. Cet aspect n'est pas surprenant mais il permet facilement de déterminer les différents états thermodynamiques dans lesquels les molécules d'eau se trouvent lorsqu'elles sont associées au ChCl. En outre, les intensités des bandes de vibration de flexion de la molécule d'eau sont très faibles et constantes pour des valeurs inférieures à 1,75 mole. Ainsi, dans une solution aqueuse saturée de ChCl, les liaisons non covalentes intermoléculaires sont particulièrement fortes, ce qui explique la faible disponibilité de la molécule d'eau une fois associée au

sel. En comparaison, l'intégration de la même bande de vibration avec un autre sel d'ammonium (ayant un chlorure comme contre-ion) était de 8,15 avec EtNH_3Cl et 16,18 avec NaCl (NB: la valeur de l'eau seule étant de 16,3). Par analogie avec ce qui a été précédemment observé avec a_w , l'intensité des vibrations de flexion augmente proportionnellement à la quantité d'eau lorsque le ratio molaire eau/ ChCl devient supérieur à 1,75.

3.3. : Mesure de l'activité thermodynamique de l'eau (a_w) dans le mélange ternaire ChCl :Eau:U

La Figure 37 représente l' a_w dans différents mélanges ternaires ChCl :Eau:U pour une quantité molaire de ChCl fixée à 1 mole.

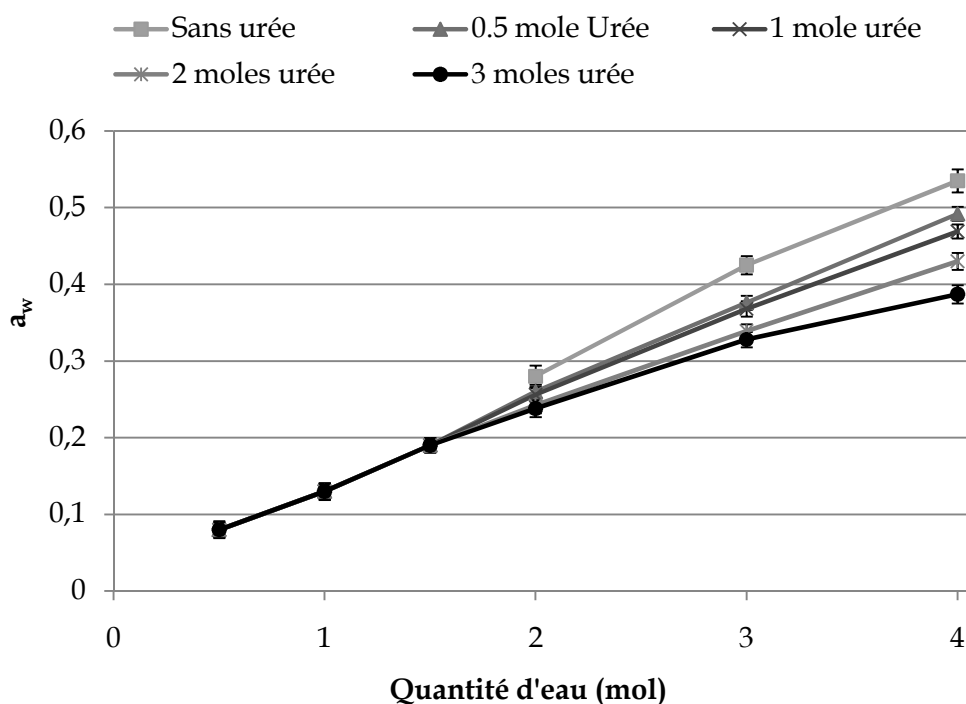


Figure 37 : Activité thermodynamique (a_w) en fonction de la quantité massique en eau dans un mélange ternaire ayant 1 mole de ChCl et x mole(s) d'urée (x=0, 0,5, 1, 2 et 3).

Les valeurs d' a_w correspondant à des quantités d'eau inférieures à 1,75 mole dans le mélange sans urée ont été volontairement retirées. En effet, ces valeurs ne peuvent pas être comparées aux autres courbes car la quantité d'eau ajoutée n'est pas suffisante pour saturer une mole de ChCl et obtenir un mélange homogène.

Là encore, les résultats mettent en évidence deux comportements thermodynamiques, quelle que soit le mélange testé. La première section, au-dessous de 1,75 mole d'eau révèle des valeurs d' a_w constantes quelle que soit la quantité d'urée ajoutée dans le mélange. La deuxième section, au-dessus de 1,75 mole d'eau, montre que la quantité d'urée impact sur la diminution de l' a_w du mélange. Ainsi, la quantité d'urée dans un mélange ternaire ChCl:Eau:U, n'affecte pas l'activité thermodynamique de l'eau lorsque le ratio molaire eau/ChCl est inférieur à 1,75. Ces résultats corroborent l'observation précédente et contribuent à expliquer l'association intermoléculaire dans ce type de mélange. Pour des ratios molaires eau/ChCl inférieurs à 1,75, l'eau est fortement liée au sel et par conséquent elle ne pourra être que très faiblement disponible pour une réactivité nucléophile ou pour l'hydratation de la lipase. Au vu de ces résultats, il semblerait que l'eau ajoutée dans un MEP à base de chlorure de cholinium soit préférentiellement associée au sel au lieu d'agir comme un agent de solvation du MEP (ChCl:U) dans son ensemble. En revanche, lorsque le ratio molaire eau/ChCl est supérieur 1,75, l'eau est beaucoup plus disponible et peut être davantage impliquée dans diverses propriétés (agent de solvation, hydratation des enzymes, réactivité nucléophile, etc...). C'est pourquoi nous avons observé un effet beaucoup plus important de l'urée sur les diminutions des valeurs d' a_w lorsque la quantité d'eau était supérieure à 1,75 mole.

En résumé, pour des ratios eau/ChCl inférieurs à 1,75 l'activité thermodynamique de l'eau sera quasi exclusivement contrôlée par le ChCl. En revanche, pour des ratios eau/ChCl supérieurs à 1,75, l' a_w pourra être ajustée par la quantité de donneur de liaisons hydrogène.

3.4. : Stabilité de la lipase B immobilisée de *Candida antarctica* (iCALB) dans un mélange ternaire ChCl:Eau:U

L'histogramme en Figure 38 représente les temps de demi-vie de la lipase iCALB à 60°C, dans les différents mélanges ternaires ChCl:Eau:U. Ces valeurs représentent les périodes de temps nécessaires pour que l'activité résiduelle de l'enzyme soit diminuée de 50% par rapport à sa valeur initiale.

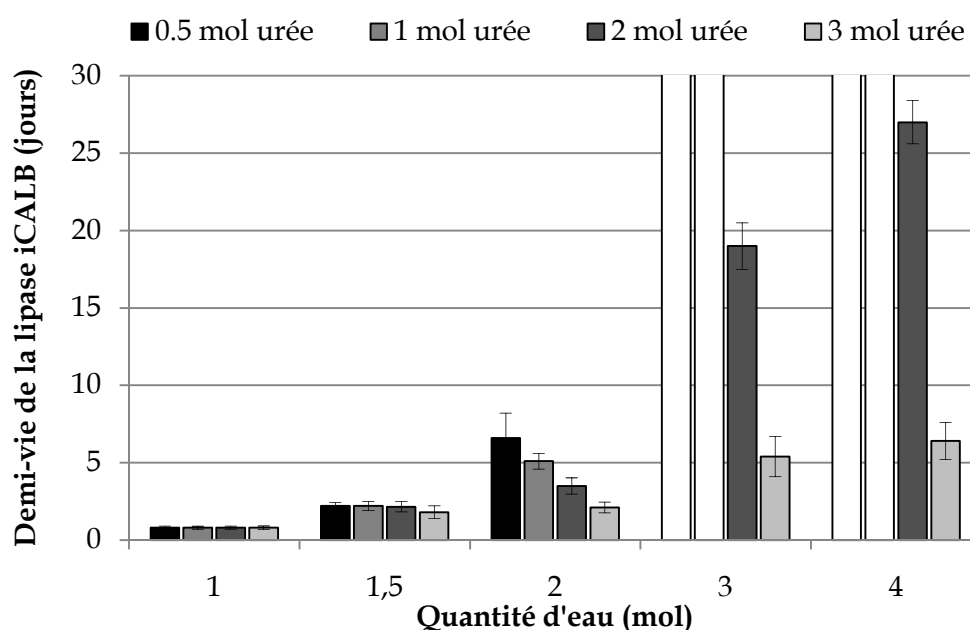


Figure 38 : Demi-vie de la lipase iCALB à 60°C dans différents mélanges ternaires ChCl:Eau:U contenant 1 mol de ChCl. La quantité d'eau varie de 1, 1,5, 2, 3 et 4 mol et celle de l'urée de 0, 0,5, 1, 2 et 3 mol).

Cette expérience met aisément en évidence l'effet protecteur de l'eau et l'effet plutôt dénaturant de l'urée sur la lipase. En effet, l'augmentation de la quantité d'eau permet de maintenir l'activité résiduelle de la lipase. Inversement, l'augmentation de la quantité d'urée réduit l'activité résiduelle de l'enzyme. Une fois de plus, la stabilité enzymatique peut être évaluée en utilisant les deux types de comportement thermodynamique décrits ci-dessus.

Comme précédemment expliqué, avec de faibles quantités d'eau (inférieures à 1.75 mole), les molécules d'eau seront fortement associées au chlorure de cholinium. En conséquence, l'enzyme ne sera que très faiblement hydratée. C'est sans doute pour cela que l'on observe une très mauvaise stabilité de la lipase pour ces faibles valeurs en eau. En revanche, pour des concentrations plus élevées, la probabilité que l'eau interagisse avec les résidus chargés et polaires de la protéine va augmenter considérablement. C'est pourquoi une augmentation significative de la stabilité de la lipase est observée.

En d'autres termes, la faible stabilité lipasique observée pour de faibles quantités d'eau (1 et 1,5 mole) est principalement due à la faible activité thermodynamique de l'eau. Par conséquent, dans ce domaine, de très petites différences dans la stabilité ont été observées entre un mélange ternaire avec 0,5 mole et 3 moles d'urée, où l'effet de dénaturation de l'urée n'est pas significatif. En revanche, pour des quantités d'eau plus élevées (2, 3 et 4 moles), la perte substantielle de l'activité résiduelle enzymatique est principalement due à l'effet de dénaturation de l'urée. Par ailleurs, il est important de souligner le fait que les mélanges contenant simultanément plus de 3 moles d'eau et moins d'une mole d'urée, constituent un milieu non dénaturant pour la lipase (demi-vie > 100 jours).

3.5. : Mesure des activités d'alcoolyse et d'hydrolyse dans les réactions catalysées par la lipase en mélange ternaire ChCl:Eau:U

La réaction d'alcoolyse du *p*-coumarate de méthyle avec le 1-octanol catalysée par iCALB, a été choisie comme réaction modèle pour déterminer l'effet de la composition du mélange ternaire sur l'avancement de la réaction. Cette dernière est réalisée à 60°C dans un ratio molaire *p*-coumarate de méthyle/1-octanol de 1:6. La Figure 39 représente les conversions et les rendements d'hydrolyse obtenus après 72 h (équilibre apparent) dans les différents mélanges ternaires ChCl:Eau:U.

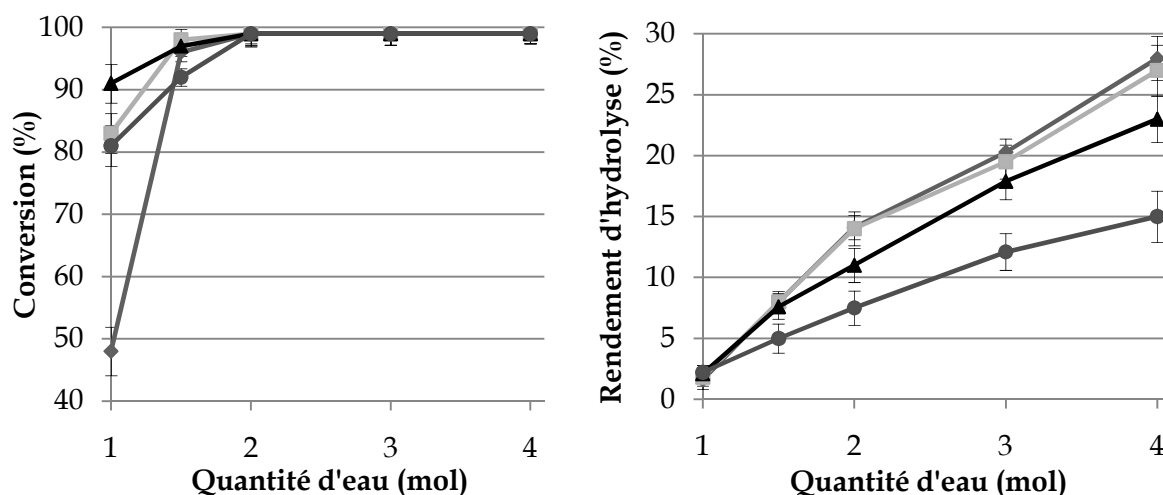


Figure 39: Conversion du *p*-coumarate de méthyle (40 mM) et rendement d'hydrolyse dans la réaction d'alcoololyse avec le 1-octanol (ratio 1:6) à 60°C en présence d'iCALB. Différents mélanges ternaires ChCl:Eau:U contenant 1 mol de ChCl ont été testés. La quantité d'eau varie de 1, 1,5, 2, 3 et 4 mol et celle de l'urée de ♦=0,5, ■=1, ▲=2 et ●=3 mol.

Les conversions partielles obtenues pour des quantités d'eau < 2 moles sont principalement dues à la faible stabilité de l'enzyme comme cela a été évoqué précédemment. Ce résultat est d'autant plus marquant que la quantité d'eau est faible, comme observé avec 1 mole d'eau pour lequel la lipase est rapidement désactivée après seulement quelques heures d'incubation. Cependant, il est important de noter que la quantité d'urée semble avoir un effet sur la réactivité du substrat et/ou l'activité de l'enzyme, ce qui confirme le rôle crucial du donneur de liaison hydrogène pour les réactions catalysées par la lipase. Il semblerait que le DLH intervienne dans la solubilisation/solvation des substrats, mais aussi sur la dynamique de la protéine (mobilité et conformation) et sur la structure tridimensionnelle de son site actif.

Pour des quantités d'eau plus élevées (à partir de 2 moles), les conversions sont maximales quelle que soit la concentration en urée. Cela signifie que la stabilité de la lipase est suffisante pour transformer tout le *p*-coumarate de méthyle. Toutefois, comme attendu par les expériences sur les valeurs de l' a_w dans ces mélanges ternaires, une réduction du taux d'hydrolyse peut être obtenue en augmentant la concentration en urée.

Par conséquent, l'urée a un double rôle dans les réactions catalysées par la lipase dans ce mélange ternaire mais malheureusement avec des effets antagonistes. En effet, elle peut aider à réduire l' a_w ce qui provoque une diminution de l'activité nucléophile de l'eau conduisant à une augmentation de la sélectivité enzymatique. A l'inverse, la présence d'urée (en particulier lorsque le ratio molaire eau/ChCl est supérieur à 1,75) entraîne une dégradation considérable de l'activité catalytique résiduelle de l'enzyme.

De toute évidence, il s'agit d'une observation assez générale et les rendements des réactions d'hydrolyses devraient varier en fonction de la nature du substrat donneur d'acyle. Cependant, en utilisant les données recueillies, il devrait être possible de prédire le comportement des réactions catalysées par des lipases dans ce type de système ternaire. En effet, la composition du mélange peut facilement être affinée pour améliorer l'efficacité de la réaction. A la vue des résultats, il est conseillé d'augmenter à la fois l'eau et la quantité en urée à un maximum, de sorte que la stabilité lipasique soit suffisante pour réaliser la réaction voulue, tout en s'assurant que l'activité d'hydrolyse reste faible.

3.6. : Influence de la concentration en alcool sur les rendements d'alcoolyse

Dans cette partie nous nous sommes concentrés à évaluer l'influence de la longueur de la chaîne alkyle de l'alcool et sa concentration sur les réactions catalysées par la lipase dans ce mélange ternaire. Le but de cette étude est de mesurer l'influence de l'alcool sur les réactions lipasiques dans ce type de milieu. Comme déjà mentionné, la liaison hydrogène est la principale force motrice dans ces milieux, ce qui signifie que plus la probabilité de former des liaisons hydrogène est forte, plus grande sera la solubilité du substrat. Ainsi, en supposant qu'une augmentation de la longueur de la chaîne alkyle de l'alcool doit diminuer sa solubilité, différents alcools de 4, 8 et 12 atomes de carbone (1-butanol, le 1-octanol et le 1-dodécanol) ont été testés.

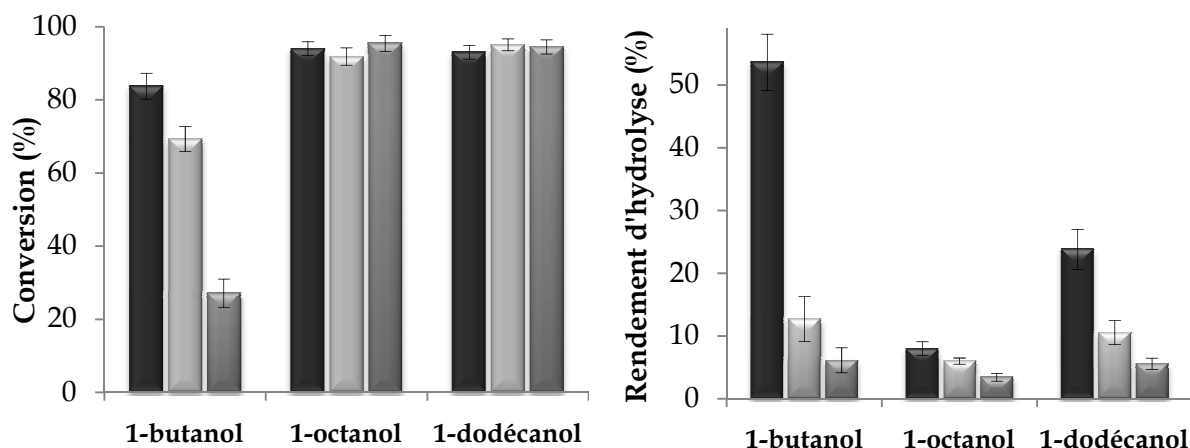


Figure 40 : Conversion du *p*-coumarate de méthyle (40 mM) et rendement d'hydrolyse de la réaction d'alcoololyse à 60°C en utilisant iCALB comme biocatalyseur et différents excès molaires d'alcools 1:3, 1:6 et 1:12. La composition molaire du mélange ternaire ChCl:Eau:U utilisée était de 1:1.5:2.

Comme le révèle la Figure 40, les conversions et les rendements d'hydrolyse ont été évalués pour trois concentrations en excès d'alcool après 72h (équilibre apparent de la réaction), correspondant à un ratio molaire en *p*-coumarate de méthyle/1-alcool de 1:3, 1:6 et 1:12. La composition molaire utilisée pour le mélange ternaire ChCl:Eau:U était 1:1.5:2.

Les résultats ont montré que la présence d'alcool, indépendamment du type, permet d'augmenter les rendements de la réaction en diminuant les taux d'hydrolyses. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle l'alcool qui n'est pas complètement dissous dans le mélange, agit comme un co-solvant pour protéger le produit contre la réactivité de l'eau. Cette interprétation permet aussi d'expliquer l'effet plus marquant de la concentration en butanol sur la diminution des taux d'hydrolyse, la solubilité de l'alcool dans le MEP étant théoriquement plus importante. De plus, cette théorie est soutenue par le fait que la même réaction effectuée en l'absence d'alcool conduit à l'hydrolyse totale du substrat après seulement 24 heures.

Par ailleurs, un excès d'alcool à chaîne courte peut réduire le taux de conversion, comme observé avec le 1-butanol. En effet, environ 83% de *p*-coumarate de méthyle

ont été transformés avec un faible excès de 1-butanol (ratio molaire 1:3), contre 69% avec un ratio 1:6, et seulement 27% avec un large excès de 1-butanol (1:12). De plus, aucune différence n'a été observée quant aux taux de conversion pour le 1-octanol et le 1-dodécanol quelle que soit leur concentration.

3.7. : Conditions de réactions optimales pour favoriser les réactions d'alcoolyse de composés phénoliques en catalyse lipasique dans ChCl:Eau:U

En utilisant les informations recueillies lors de ces recherches, nous avons été en mesure d'optimiser les conditions de réaction dans le but de maximiser la performance de la catalyse lipasique (taux de conversion plus élevés, tout en minimisant les réactions d'hydrolyse compétitives).

Par conséquent, nous avons effectué des réactions d'alcoolyse pour deux types de substrat (*p*-coumarate de méthyle et férulate de méthyle) avec des alcools aliphatiques de différentes longueurs de chaîne alkyle dans un ratio molaire de 1:6 (rendements les plus élevés quelle que soit la polarité de l'alcool).

Dans le cas particulier des réactions d'alcoolyse du *p*-coumarate de méthyle, le ratio molaire du mélange ternaire (ChCl:Eau:U) était de 1:1.5:2. La composition a été adaptée dans le but de favoriser la cinétique de la réaction, la stabilité de la lipase et les taux de conversions, tout en essayant de minimiser la réaction d'hydrolyse afin de maximiser la production en composé lipophile.

Concernant les réactions d'alcoolyse utilisant le férulate de méthyle comme substrat donneur d'acyle, nous avons préparé un mélange ternaire (ChCl:Eau:U) avec un ratio molaire de 1:2:2. La réaction d'hydrolyse concurrentielle étant très inférieure à celle observée avec le *p*-coumarate de méthyle, il a été possible d'augmenter la quantité d'eau dans le mélange. Ainsi, l'activité résiduelle de la lipase a été améliorée ce qui permet une durée d'activité catalytique plus longue.

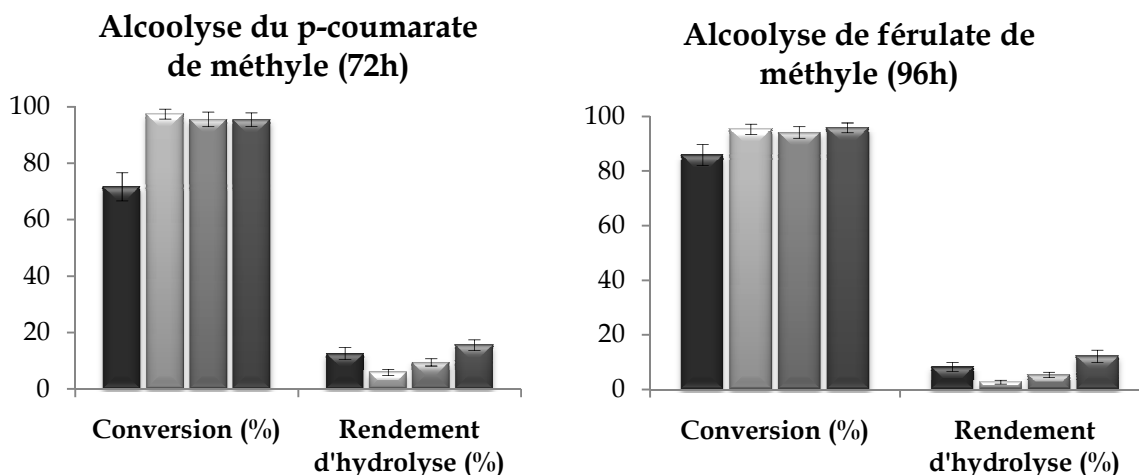


Figure 41 : Conversion du composé phénolique (40 mM) et rendement d'hydrolyse de la réaction d'alcoololyse à 60°C en utilisant iCALB, avec différentes longueurs de la chaîne alkyle de l'alcool 1-butanol \blacksquare , 1-octanol \blacksquare , 1-dodécanol \blacksquare et 1-hexadécanol \blacksquare . Les compositions molaires des mélanges ternaires de ChCl:Eau:U sont respectivement de 1:1.5:2 et 1:2:2 pour le *p*-coumarate et férulate méthyle.

Comme représentés sur la Figure 41, des taux de conversion très élevés ont été observés pour les deux substrats, quelle que soit l'alcool sélectionné. Ainsi, l'ensemble des composés dérivés lipophiles d'acides férulique et coumarique de C4 à C16 (à chaîne aliphatique) a été synthétisé avec succès.

3.8. : Conclusion

L'objectif principal de l'étude était de comprendre comment les différents composants impliqués dans ces mélanges pourraient contribuer à leurs propriétés fonctionnelles dans le milieu. Pour appréhender cela, nous avons en préambule mesuré les activités thermodynamiques de l'eau en solution aqueuse de chlorure de cholinium. Globalement, les valeurs ont été particulièrement faibles ce qui indique que le chlorure de cholinium et l'eau sont très fortement liés par des liaisons hydrogène. Cette association très forte a été confirmée par les très faibles intensités de vibrations de flexion de l'eau. De plus, nous avons démontré l'existence de deux zones thermodynamiquement très différentes. La première correspond à un ratio

molaire eau/ChCl inférieure à 1,75, et la seconde correspond à de plus grandes quantités d'eau.

Pour les réactions catalysées par la lipase iCALB, la deuxième partie semble être davantage adaptée à sa stabilité avec une activité catalytique qui peut être préservée pendant plusieurs jours. Toutefois, un excès d'eau peut conduire à des réactions compétitives d'hydrolyses élevées. Néanmoins, l'urée et l'alcool peuvent avoir un effet positif sur la réduction des rendements d'hydrolyse. Le premier en diminuant l' a_w , le second en agissant en tant que co-solvant pour protéger le produit contre la réactivité de l'eau. Cependant, la concentration de l'urée doit être maintenue aussi faible que possible afin de protéger l'activité catalytique de la lipase. En effet, nous avons constaté qu'une trop forte quantité d'urée pouvait être néfaste à la stabilité enzymatique.

La maîtrise et la compréhension de tous ces paramètres nous ont permis d'affiner les conditions de réaction pour optimiser la catalyse enzymatique de réactions d'alcoolyses. Malgré les difficultés rencontrées lors de la réalisation de réactions catalysées par la lipase avec des substrats de deux polarités différentes, nous sommes toutefois parvenus à synthétiser toute une gamme de dérivés lipophiles d'acides férulique et coumarique de C4 à C16 (chaîne aliphatique) avec des rendements élevés.

Notre étude a été basée sur le solvant (ChCl:U), qui a été décrit comme étant le plus efficace pour les réactions catalysées par la lipase. Toutefois, nous considérons que ce comportement reflète tous les mélanges obtenus après association du chlorure de cholinium avec l'eau et un donneur de liaison hydrogène. Par conséquent, à partir du moment où le donneur de liaison hydrogène n'est pas impliqué dans le modèle de réaction choisi, toute une palette de molécules pourrait tout à fait être testées et adaptées pour des applications spécifiques.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le challenge de ces travaux de thèse était d'estimer le potentiel des mélanges eutectiques profonds (MEP) comme nouveaux milieux réactionnels pour la biotransformation à l'aide de lipases, le but étant de développer de nouveaux solvants plus performants pour la réalisation de réactions de lipophilisation par voie enzymatique. Actuellement, ces réactions sont très complexes à mettre en œuvre en raison de la difficulté à trouver un solvant permettant à la fois une bonne solubilisation des substrats polaires tout en permettant une bonne activité et stabilité des lipases. De plus, outre les difficultés à trouver un procédé capable d'améliorer l'efficacité des synthèses de lipophilisation, d'autres critères sont aussi à prendre en considération. Le coût et les difficultés de synthèse du milieu réactionnel, sa dangerosité et sa toxicité mais aussi sa biodégradabilité sont autant de paramètres à considérer pour permettre d'accroître le développement d'un solvant idoine. Sur ces derniers points, les MEP remplissaient admirablement les critères.

L'étude préliminaire que nous avons menée consistait en la réalisation d'une réaction modèle d'alcoolyse d'un substrat vinylique par différentes longueurs de chaîne d'alcool dans plusieurs MEP. Ces premiers résultats ont permis d'obtenir des informations essentielles sur l'efficacité de la catalyse lipasique (iCALB) dans ce type de solvant. Nous avons pu constater que la nature des composants du mélange, que ce soit le sel et/ou le donneur de liaison hydrogène pouvaient tous deux fortement influencer les résultats de la biocatalyse. Ainsi, les solvants exposaient des propriétés physico-chimiques complètement divergentes selon la nature des constituants. Par exemple, en changeant la nature du sel en association avec le glycérol comme donneur de liaison hydrogène (DLH), les résultats catalytiques sont fortement influencés. Même conclusion en changeant la nature du DLH en association avec le chlorure de cholinium (ChCl) comme sel. Par ailleurs, ces résultats ont révélé que certains MEP pouvaient interagir dans la réaction enzymatique entraînant la formation de produits secondaires indésirables. Ce désavantage peut être un sérieux handicap à leur développement pour ce type d'application. Toutefois, ce premier

chapitre nous aura permis de constater que deux des solvants analysés, à savoir ChCl:U et ChCl:Gly, méritaient une évaluation plus approfondie pour être utilisés comme milieux réactionnels en vue d'une catalyse lipasique. En effet, ces solvants permettent d'obtenir d'excellents résultats de biotransformation sans réactivité apparente de ces constituants.

Le deuxième chapitre a consisté en la réalisation d'une réaction d'alcoololyse du *p*-coumarate et férulate de méthyle par le 1-octanol dans ChCl:U et ChCl:Gly, permettant une approche plus approfondie du potentiel de ces solvants. Cette étude a mis en évidence la nécessité d'ajouter des quantités d'eau non négligeables pour permettre de favoriser de façon effective l'activité enzymatique. Par exemple, pour des teneurs en eau de 8% et 10% (p/p) dans ChCl:U, des taux de conversion très élevés (respectivement 93% et 98%) ont pu être atteints. De plus, les résultats ont montré une très nette supériorité catalytique de la lipase iCALB dans ChCl:U par rapport à ChCl:Gly. De ce fait, ChCl:U en mélange avec de l'eau apparaît comme étant un milieu réactionnel biodégradable, facile à synthétiser, sans danger, sans toxicité et hautement efficace pour réaliser des modifications de molécule d'intérêt en utilisant la lipase B de *Candida antarctica*. Cette conclusion a été très fortement renforcée après le screening de plusieurs MEP et de lipases commerciales. De plus, plusieurs paramètres tels que l'activité thermodynamique de l'eau (a_w), le pH des milieux réactionnels, l'influence du donneur de liaison hydrogène et l'activité résiduelle en fonction de la teneur en eau dans les MEP ont été étudiés. Globalement, ces études ont permis de constater que la très faible activité de la lipase dans les MEP purs ou très faiblement hydratés, pouvait s'expliquer par la forte association entre le substrat et le réseau de liaisons hydrogène associé à une très faible a_w . De plus, l'eau dans un MEP permet de préserver significativement l'activité catalytique de l'enzyme. Concernant les valeurs de pH dans ces MEP hydratés, l'ajout progressif d'eau ne provoque pas de variation significative des valeurs et surtout ne conditionne pas l'activité ou non de la lipase dans ces milieux.

Enfin, dans le but d'apporter des informations essentielles sur la structure et l'organisation supramoléculaire de ces solvants, nous nous sommes intéressés à

définir le rôle et l'influence des éléments constitutifs de ces mélanges. En particulier, il nous a semblé important de fournir des informations crédibles sur la disponibilité de l'eau pour contribuer à des propriétés fonctionnelles dans l'environnement (réactivité, hydratation de l'enzyme). Ainsi, dans ce troisième chapitre nous avons démontré l'existence de deux zones thermodynamiquement très différentes, zones qui conditionnent l'influence et l'effet de l'eau. Pour des ratios molaires eau/ChCl inférieurs à 1,75, l'eau va interagir principalement avec le sel par le biais de très fortes liaisons intermoléculaires. Sa disponibilité sera telle qu'elle ne pourra participer que très faiblement à des réactions compétitives d'hydrolyses ou intervenir convenablement dans l'hydratation de l'enzyme. En revanche, pour des ratios molaires eau/ChCl supérieurs à 1,75 la probabilité qu'a l'eau à participer à ses différentes actions sera grandement accrue. De même, nous avons démontré que l'urée et l'alcool peuvent avoir un effet positif sur la réduction des rendements d'hydrolyses. Le premier en diminuant l' a_w , le second en agissant en tant que co-solvant pour protéger le produit contre la réactivité de l'eau. Néanmoins, il a également été démontré que l'urée pouvait agir comme agent dénaturant pour la lipase et de ce fait sa concentration devra être maintenue aussi faible que possible afin de protéger l'activité catalytique de l'enzyme. Ces résultats ont permis d'une part, de comprendre l'organisation de ce type de mélange, mais d'autre part, de finement adapter les conditions d'hydrolyse biocatalysées par les lipases. De cette façon, nous sommes parvenus à synthétiser avec des rendements élevés, toute une gamme de dérivés lipophiles d'acides férulique et coumarique avec des longueurs de chaîne aliphatique de C4 à C16.

Que ce soit d'un point de vue fondamental ou appliqué, ces travaux de thèse fournissent des informations essentielles sur l'utilisation de cette nouvelle gamme de solvants dans le domaine de la biocatalyse. Les recherches fondamentales les plus exhaustives ont été menées dans le mélange ternaire ChCl:Eau:U. Toutefois, nous pensons que les conclusions obtenues dans ce milieu peuvent être extrapolées à tous les mélanges obtenus après associant du chlorure de cholinium avec l'eau et un donneur de liaison hydrogène. De ce fait, une large gamme de molécules à potentiel donneur de liaison hydrogène pourrait être testée et adaptée pour des applications

spécifiques. Concernant les réactions biocatalysées par les lipases dans ces mélanges ternaires du type ChCl:Eau:DLH, nous avons décrit une organisation structurale qui laisse présager que la compétitivité réactionnelle, basée sur la polarité, entre le DLH et le substrat pourrait limiter l'utilisation de ces mélanges. C'est pourquoi, l'idéal serait d'utiliser un DLH qui n'entre pas en compétition dans le modèle de réaction choisi. Le rôle du DLH reste encore obscur, mais nous avons souligné tout au long de ce mémoire son importance et son influence sur la réussite d'une biotransformation lipasique. Nous pensons qu'il intervient dans la conformation, l'état mais aussi la stabilité de l'enzyme. Cependant, une des solutions pour contourner tous ces éventuels problèmes liés à la présence et à la réactivité possible du DLH, serait d'utiliser le substrat à la fois comme DLH et comme réactif. Par exemple, il a été démontré que le ChCl et l'acide *p*-coumarique pouvaient former un mélange liquide à 67°C en étant associés dans un ratio molaire de 1 pour 0,5, ce qui correspond à une diminution de la température de fusion de l'acide phénolique de presque 150°C. En d'autres termes, serait-il possible de rendre liquide le substrat valorisable en créant des affinités intermoléculaires avec une tierce molécule pour lui permette de réagir dans des réactions ? Cette association impliquera sans doute une diminution de la disponibilité et la réactivité du substrat, cependant dans le premier chapitre nous avons pu constater que certains DLH pouvaient rester fortement réactifs. De façon générale, nous pensons avec insistance que de réelles avancées technologiques peuvent être réalisées dans de nombreux domaines en utilisant ce type de méthode.

ANNEXES

1 : Compositions et températures de fusion des mélanges eutectiques profonds

Sel Cationique	Contre ion négatif	Donneur Liaison Hydrogène	Ratio molaire	T° _{fusion} (°C)
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Urée	1:2	12
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Thiourée	1:2	69
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	1-Méthyl urée	1:2	29
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	1,3-Diméthylurée	1:2	70
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	1,1-Diméthylurée	1:2	149
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acétamide	1:2	51
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Benzamide	1:2	92
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Ethylène glycol	1:2	-66
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Glycérol	1:2	-40
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	2,2,2-Trifluoroacétamide	1:2	-45
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Imidazole	3:7	56
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide adipique	1:1	85
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide benzoïque	1:1	95
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide citrique	1:1	69
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide malonique	1:1	10
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide oxalique	1:1	34
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide succinique	1:1	71
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide Phenylacétique	1:1	25
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide Phenylpropionique	1:1	20
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide tricarballoylique	1:1	90
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide levulinique	1:2	ambiante
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide itaconique	1:1	57
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Glucose	1:1	15
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Xylitol	1:1	ambiante
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	D-sorbitol	1:1	ambiante

Cholinium (Ch)	Cl ⁻	L-(+)-Acide tartarique	1:0.5	47
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	D-Isosorbide	1:2	ambiante
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide 4-Hydroxybenzoïque	1:0.5	87
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide caféique	1:0.5	67
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide p coumarique	1:0.5	67
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide trans cinnamique	1:1	93
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide subérique	1:1	93
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide gallique	1:0.5	77
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Resorcinol	1:4	87
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	1,2butanediol	1:2	-
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	1,3butanediol	1:2	-
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	2,3butanediol	1:2	-
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	1,6hexanediol	1:2	-
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	1,4butanediol	1:3	-32
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide mandelique	1:2	33
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide valérique	1:2	22
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide glutamique	1:2	13
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Mannitol	1:1	108
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	D-fructose	1:2	5
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Vanilline	1:2	17
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Glycine	1:1	-61
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Alanine	1:1	-56
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Sérine	1:1	-55
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Threonine	1:1	-39
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Valine	1:1	-74
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Leucine	1:1	-47
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Isoleucine	1:1	-47
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Méthionine	1:1	-61
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Phénylalanine	1:1	-60
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Tryptophane	1:1	-12
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Proline	1:1	-44
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide aspartique	1:1	-22
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide glutamique	1:1	-18
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Asparagine	1:1	-14
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Glutamine	1:1	-40

Annexes

Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Lysine	1:1	-48
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Histidine	1:1	-40
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Arginine	1:1	-10
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide lactique	1:1	-
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide maleique	1:1	-
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	DL-Acide malique	1:1	-
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide citrique	1:1	-
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Acide aconitique	1:1	-
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Glycol	1:1	-
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	meso-Erythritol	2:1	-
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Adonitol	5:2	-
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Ribitol	5:2	-
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	A-L-Rhamnose	2:1	-
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	D-(-)-Fructose	5:2	-
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	D-Mannose	5:2	-
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	D-(+)-Galactose	5:2	-
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	D-(+)-Trehalose	4:1	-
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Maltose	4:1	-
Cholinium (Ch)	Cl ⁻	Raffinose	11:2	-
Cholinium (Ch)	F ⁻	Urée	1:2	1
Cholinium (Ch)	BF ₄ ⁻	Urée	1:2	67
Cholinium (Ch)	NO ₃ ⁻	Urée	1:2	4
Cholinium (Ch)	AcO ⁻	Urée	1:2	18
Cholinium (Ch)	AcO ⁻	Ethylène glycol	1:2	23
Cholinium (Ch)	AcO ⁻	Glycérol	1:1.5	13
Ethyl ammonium (EA)	Cl ⁻	2,2,2-Trifluoroacétamide	1:1.5	20
Ethyl ammonium (EA)	Cl ⁻	Acétamide	1:1.5	20
Ethyl ammonium (EA)	Cl ⁻	Urée	1:1.5	29
Ethyl ammonium (EA)	Cl ⁻	Glycérol	1:4	-57
L-Carnitine		Urée	2:3	74
Betaine hydrochloride	Cl ⁻	Urée	15:85	27
Tétrapropyl ammonium	Br ⁻	Glycérol	1:4	-59
Tétraethyl ammonium	Br ⁻	Urée	1:2	113
Tétrabutyl ammonium	Br ⁻	Imidazole	3:7	21
Benzyl diméthyl(2-hydroxyéthyl) ammonium	Cl ⁻	Urée	1:2	-33

Monoéthylcholinium	Cl ⁻	Urée	1:2	-38
Benzyltriméthyl ammonium	Cl ⁻	Urée	1:2	26
Acétylcholinium	Cl ⁻	Glycérol	1:4	-60
Acétylcholinium	Cl ⁻	Urée	1:2	-14
(2-Chloroéthyl)triméthyl ammonium	Cl ⁻	Urée	1:2	15
(2-Chloroéthyl)triméthyl ammonium	Cl ⁻	Glycérol	1:4	-54
(2-fluoroéthyl)triméthyl ammonium	Br ⁻	Urée	1:2	55
Benzyl dihydroxyéthyl(2-méthyl) ammonium	Cl ⁻	Urée	1:2	-6
N,N-diéthylèneethanol ammonium	Cl ⁻	Glycérol	1:4	2
N,N-diéthylèneethanol ammonium	Cl ⁻	Ethylène glycol	1:3	-23
N,N-diéthylèneethanol ammonium	Cl ⁻	2,2,2-Trifluoroacétamide	1:2	0
Triméthylcyclohexyl ammonium	CH ₃ SO ₃ ⁻	Acide <i>p</i> -toluène sulfonique	1:1	53
Triméthylbenzyl ammonium	CH ₃ SO ₃ ⁻	Acide <i>p</i> -toluène sulfonique	1:1	-3
Triméthyl octyl ammonium	CH ₃ SO ₃ ⁻	Acide <i>p</i> -toluène sulfonique	1:1	58
Triméthylcyclohexyl ammonium	<i>p</i> -toluène sulfonate	Acide <i>p</i> -toluène sulfonique	1:1	47
Méthyltriphényl phosphonium	Br ⁻	Glycérol	1:3	-5
Méthyltriphényl phosphonium	Br ⁻	Ethylène glycol	1:4	-49
Méthyltriphényl phosphonium	Br ⁻	Triéthylène glycol	1:5.25	-22
Méthyltriphényl phosphonium	Br ⁻	2,2,2-Trifluoroacétamide	1:8	-69
Benzyltriphényl phosphonium	Cl ⁻	Glycérol	1:5	50
Benzyltriphényl phosphonium	Cl ⁻	Ethylène glycol	1:3	48
Benzyltriphényl phosphonium	Cl ⁻	2,2,2-Trifluoroacétamide	3:1	99
Allyltriphénylphosphonium	Br ⁻	Acide <i>p</i> -toluène sulfonique	1:3	ambiante

Tableau 27 : Compositions et températures de fusion des MEP extraits de la Littérature.

2 : Compositions et caractéristiques physico-chimiques des NADES

Composition NADES	Ratio molaire	Densité (40°C) g/cm ³	Viscosité (40°C) mm ² /s	T _{décom} °C	T _g (°C)	E _{NR} (Kcal/mol)
acide malique:ChCl:eau	1:1:2	1.2303	445.9	201	-71.32	44.81
glycerol:ChCl:eau	2:1:1	1.1742	51.3	187	-101.59	49.55
acide malique:alanine:eau	1:1:3	1.352	174.6	164	-70.88	48.05
proline:acide malique:eau	1:1:3	1.3184	251	156	-61.29	48.3
fructose:ChCl:eau	2:5:5	1.2078	280.8	160	-84.58	49.81
xylose:ChCl:eau	1:2:2	1.2095	308.3	178	-81.8	49.81
sucrose:ChCl:eau	1:4:4	1.2269	581	>200	-82.96	49.72
fructose:glucose:sucrose:eau	1:1:1:11	1.3657	720	138	-50.77	48.21
glucose:ChCl:eau	2:5:5	1.2069	397.4	170	-83.86	49.72
1,2-propanediol:ChCl:eau	1:1:1	1.0833	33	162	-109.55	50.07
acide lactique:glucose:eau	5:1:3	1.2497	37	135	-77.06	44.81
sorbitol:ChCl:eau	2:5:6	1.1854	138.4	>200	-89.62	49.98
xylitol:ChCl:eau	1:2:3	1.17841	86.1	>200	-93.33	49.72

Référence : (Dai *et al.*, 2013)

Tableau 28 : Compositions et caractéristiques physico-chimiques des NADES.

3 : Compositions et températures de fusion de différents LTTM

Molécule 1	Molécule 2	Ratio molaire	Tg (°C) ou Tf (°C)*	Référence
Acide lactique	Alanine	9:1	59.31	(Francisco <i>et al.</i> , 2012)
Acide lactique	Bétaïne	2:1	48.86	
Acide lactique	Glycine	9:1	54.51	
Acide lactique	Histidine	9:1	39.22	
Acide lactique	Proline	2:1	36.69	
Acide malique	Alanine	1:1	42.64	
Acide malique	Bétaïne	1:1	20.01	
Acide malique	Glycine	1:1	34.08	
Acide malique	Proline	1:1	13.64	
Acide malique	Histidine	2:1	-	
Acide malique	Acide nicotinique	9:1	-	
Acide oxalique dihydraté	Bétaïne	1:1	17.19	
Acide oxalique dihydraté	Proline	1:1	42.91	
Acide oxalique dihydraté	Glycine	3:1	-	
Acide oxalique dihydraté	Acide nicotinique	9:1	-	
Acide oxalique dihydraté	Histidine	9:1	-	
Acide oxalique	Proline	1:1	14.45	
Acide citrique	1,3-Diméthylurée	40:60	65*	(Imperato <i>et al.</i> , 2006)
Manose	1,3-Diméthylurée	30:70	75*	
Fructose	1,3-Diméthylurée	40:60	80*	
Lidocaine	1,8 Octanediol	1:1	41.8*	(Serrano <i>et al.</i> , 2011)
Lidocaine	Acide hexanoïque	1:1	-56	(Bica <i>et al.</i> , 2011)
Lidocaine	Acide décanoïque	1:1	-60	
Lidocaine	Acide stéarique	1:1	43	
Lidocaine	Acide oléique	1:1	-48	
Lidocaine	Acide linoléique	1:1	-64	

Caprolactame	Acide benzoïque	1:1	-5*	(Liu <i>et al.</i> , 2013)
Caprolactame	Acétamide	1:1	-8*	
Caprolactame	Imidazole	1:1	-10*	
Caprolactame	Acide o-toluïc	2:1	0*	
Caprolactame	Acide furoïque	1:1	-10*	
L-Carnitine	Urée	2:3	74*	(Ilgen <i>et al.</i> , 2009)
Acide lactique	Alanine	1:1	-	(Dai <i>et al.</i> , 2013)
Acide lactique	D-(+)-Glucose	5:1	-	
DL-acide malique	D-xylose	1:1	-	
DL-acide malique	D-(+)-Glucose	1:1	-	
DL-acide malique	Sucrose	1:1	-	
DL-acide malique	D-(-)-Fructose	1:1	-	
DL-acide malique	D-Mannose	1:1	-	
DL-acide malique	Maltose	2:1	-	
DL-acide malique	D-(+)-Trehalose	2:1	-	
DL-acide malique	Lactose	2:1	-	
DL-acide malique	Raffinose	3:1	-	
DL-acide malique	Xylitol	1:1	-	
Bétaine	D-(+)-Glucose	5:2	-	
Bétaine	Sucrose	2:1	-	
Bétaine	D-(+)-trehalose	4:1	-	
Bétaine	D-Sorbitol	3:1	-	
Bétaine	DL-Acide malique	1:1	-	
Bétaine	L-(+)-Acide tartarique	2:1	-	
Bétaine	D-Mannose	5:2	-	
Bétaine	Acide citrique	1:1	-	

Tableau 29 : Compositions et températures de fusion des LTTM extraits de la Littérature.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abbott AP, Boothby D, Capper G, Davies DL, Rasheed RK. Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: Versatile alternatives to ionic liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 29, p. 9142-9147, 2004.

Abbott AP, Capper G, Davies DL, McKenzie KJ, Stephen UO. Solubility of metal oxides in deep eutectic solvents based on choline chloride. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 51, n. 4, p. 1280-1282, 2006a.

Abbott AP, Capper G, Davies DL, Rasheed RK, Tambyrajah V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. **Chemical Communications**, n. 1, p. 70-71, 2003.

Abbott AP, Capper G, Davies DL, Shikotra P. Processing metal oxides using ionic liquids. **Mineral Processing and Extractive Metallurgy**, v. 115, n. 1, p. 15-18, 2006b.

Abbott AP, Capper G, McKenzie KJ, Glidle A, Ryder KS. Electropolishing of stainless steels in a choline chloride based ionic liquid: an electrochemical study with surface characterisation using SEM and atomic force microscopy. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 8, n. 36, p. 4214-4221, 2006c.

Abbott AP, Capper G, McKenzie KJ, Ryder KS. Electrodeposition of zinc-tin alloys from deep eutectic solvents based on choline chloride. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 599, n. 2, p. 288-294, 2007a.

Abbott AP, Cullis PM, Gibson MJ, Harris RC, Raven E. Extraction of glycerol from biodiesel into a eutectic based ionic liquid. **Green Chemistry**, v. 9, n. 8, p. 868-872, 2007b.

Abbott AP, El Ttaib K, Frisch G, McKenzie KJ, Ryder KS. Electrodeposition of copper composites from deep eutectic solvents based on choline chloride. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 11, n. 21, p. 4269-4277, 2009.

Abbott AP, El Ttaib K, Ryder KS, Smith EL. Electrodeposition of nickel using eutectic based ionic liquids. **Transactions of the Institute of Metal Finishing**, v. 86, n. 4, p. 234-240, 2008.

Abbott AP, Harris RC, Ryder KS. Application of Hole Theory to Define Ionic Liquids by their Transport Properties. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 18, p. 4910-4913, 2007c.

Abbott AP, Harris RC, Ryder KS, D'Agostino C, Gladden LF, Mantle MD. Glycerol eutectics as sustainable solvent systems. **Green Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 82-90, 2011.

Abbott AP, Nandhra S, Postlethwaite S, Smith EL, Ryder KS. Electroless deposition of metallic silver from a choline chloride-based ionic liquid: a study using acoustic impedance spectroscopy, SEM and atomic force microscopy. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 9, n. 28, p. 3735-3743, 2007d.

Abbott AP, Capper G, Gray S. Design of improved deep eutectic solvents using hole theory. **ChemPhysChem**, v. 7, n. 4, p. 803-806, 2006d.

Alpert AJ. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 499, p. 177-196, 1990.

Aziz S, Dutilleul P, Kermasha S. Lipase-catalyzed transesterification of krill oil and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid in solvent-free medium using response surface methodology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 84, p. 189-197, 2012.

Azizi N, Batebi E. Highly efficient deep eutectic solvent catalyzed ring opening of epoxides. **Catalysis Science & Technology**, v. 2, n. 12, p. 2445-2448, 2012a.

Azizi N, Batebi E, Bagherpour S, Ghafuri H. Natural deep eutectic salt promoted regioselective reduction of epoxides and carbonyl compounds. **RSC Advances**, v. 2, n. 6, p. 2289-2293, 2012b.

Azizi N, Dezfuli S, Hahsemi MM. Eutectic salt catalyzed environmentally benign and highly efficient biginelli reaction. **Scientific World Journal**, v. 2012, p. 6, 2012c.

Azizi N, Gholibeglo E. A highly efficient synthesis of dithiocarbamates in green reaction media. **RSC Advances**, v. 2, n. 19, p. 7413-7416, 2012d.

Azizi N, Manocheri Z. Eutectic salts promote green synthesis of bis(indolyl) methanes. **Research on Chemical Intermediates**, v. 38, n. 7, p. 1495-1500, 2012e.

B

Babicz I, Selma Leite GF, Rodrigo de Souza OMA, Antunes OAC. Lipase-catalyzed diacylglycerol production under sonochemical irradiation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 17, n. 1, p. 4-6, 2010.

Bagi K, Simon LM. Comparison of esterification and transesterification of fructose by porcine pancreas lipase immobilized on different supports. **Biotechnology Techniques**, v. 13, n. 5, p. 309-312, 1999.

Balcão VM, Paiva AL, Xavier Malcata F. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 6, p. 392-416, 1996.

Barrett MJ, Hwang I, Swartling DJ. Knoevenagel coupling of Meldrum's acid with aromatic aldehydes using DMF, ionic liquid, and deep eutectic solvent systems. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 241, p. 1, 2011.

Beckman EJ. Supercritical and near-critical CO₂ in green chemical synthesis and processing. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 28, n. 2-3, p. 121-191, 2004.

Ben salah A, Fendri K, Gargoury Y. La lipase de *Rhizopus oryzae*: production, purification et caractéristiques biochimiques. **Revue française des corps gras**, v. 41, n. 5, p. 133-137, 1994.

Berrios M, Skelton RL. Comparison of purification methods for biodiesel. **Chemical Engineering Journal**, v. 144, n. 3, p. 459-465, 2008.

Borse BN, Borude VS, Shukla SR. Synthesis of novel dihydropyrimidin-2(1H)-ones derivatives using lipase and their antimicrobial activity. **Current Chemistry Letters**, v.1, n. 2, p. 59-68, 2012.

Bi WT, Tian ML, Row KH. Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization. **Journal of Chromatography A**, v. 1285, p. 22-30, 2013.

Bica K, Rogers RD. Confused ionic liquid ions-a "liquification" and dosage strategy for pharmaceutically active salts. **Chemical Communications**, v. 46, n. 8, p. 1215-1217, 2010.

Bica K, Shamshina J, Hough WL, MacFarlane DR, Rogers RD. Liquid forms of pharmaceutical co-crystals: exploring the boundaries of salt formation. **Chemical Communications**, v. 47, n. 8, p. 2267-2269, 2011.

Bjorkling F, Godtfredsen SE, Kirk O. A highly selective enzyme-catalysed esterification of simple glucosides. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 14, p. 934-935, 1989.

Brady L, Brzozowski AM, Derewenda ZS, Dodson E, Dodson G, Tolley S, Turkenburg JP, Christiansen L, Huge-Jensen B, Norskov L. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v. 343, n. 6260, p. 767-770, 1990.

Brzozowski AM, Derewenda U, Derewenda ZS, Dodson GG, Lawson DM, Turkenburg JP, Bjorkling F, Huge-Jensen B, Patkar SA, Thim L. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. **Nature**, v. 351, n. 6326, p. 491-494, 1991.

Buchholz K, Kasche V, Bornscheuer UT. **Biocatalysts and Enzyme Technology**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, chap. 7, p. 288, 2005.

Buisman GJH, Van Helteren CTW, Kramer GFH, Veldsink JW, Derksen JTP, Cuperus FP. Enzymatic esterifications of functionalized phenols for the synthesis of lipophilic antioxidants. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 2, p. 131-136, 1998.

C

Canongia Lopes JN, Costa Gomes MF, Padua AAH. Nonpolar, polar, and associating solutes in ionic liquids. **The Journal of Physical Chemistry. B**, v. 110, n. 34, p. 16816-16818, 2006.

Celia E, Cernia E, Palocci C, Soro S, Turchet T. Tuning *Pseudomonas cepacea* lipase (PCL) activity in supercritical fluids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, n. 2, p. 193-199, 2005.

Chamouleau F, Coulon D, Girardin M, Ghoul M. Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, n. 4-6, p. 949-954, 2001.

Chuang WC, Mohanprasad AD, Willam RS, Galen JS. Removal of residual catalyst from simulated biodiesel's crude glycerol for glycerol hydrogenolysis to propylene glycol. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 45, n. 2, p. 791-795, 2006.

Choi YH, Spronsen JV, Dai Y, Verberne M, Hollmann F, Isabel WCEA, Witkamp GJ, Verpoorte R. Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? **Plant Physiology**, v. 156, n. 4, p. 1701-1705, 2011.

Cooper ER, Andrews CD, Wheatley PS, Webb PB, Wormald P, Morris RE. Ionic liquids and eutectic mixtures as solvent and template in synthesis of zeolite analogues. **Nature**, v. 430, n. 7003, p. 1012-1016, 2004.

Costa MAF, Peralta RM. Production of lipase by soil fungi and partial characterization of lipase from a selected strain (*Penicillium wortmanii*). **Journal of Basic Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 11-15, 1999.

Coulembier O, Lemaure V, Josse T, Minoia A, Cornil J, Dubois P. Synthesis of poly(l-lactide) and gradient copolymers from a l-lactide/trimethylene carbonate eutectic melt. **Chemical Science**, v. 3, n. 3, p. 723-726, 2012.

D

D'Agostino C, Harris RC, Abbott AP, Gladden LF, Mantle MD. Molecular motion and ion diffusion in choline chloride based deep eutectic solvents studied by ¹H pulsed field gradient NMR spectroscopy. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 48, p. 21383-21391, 2011.

Dai Y, Spronsen JV, Witkamp GJ, Verpoorte R, Hae Y. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. **Analytica Chimica Acta**, v. 766, n. 5, p. 61-68, 2013.

De Santi V, Cardellini F, Brinchi L, German R. Novel Bronsted acidic deep eutectic solvent as reaction media for esterification of carboxylic acid with alcohols. **Tetrahedron Letters**, v. 53, n. 38, p. 5151-5155, 2012.

Destain J, Roblain D, Thonart P. Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 2, p. 105-108, 1997.

Dhake KP, Deshmukh KM, Patil YP, Singhal RS, Bhanage BM. Improved activity and stability of *Rhizopus oryzae* lipase via immobilization for citronellol ester synthesis in supercritical carbon dioxide. **Journal of Biotechnology**, v. 156, n. 1, p. 46-51, 2011.

Dossat V, Combes D, Marty A. Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 3-5, p. 194-200, 1999.

Dudal Y, Lortie R. Influence of water activity on the synthesis of triolein catalyzed by immobilized *Mucor miehei* lipase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 45, n. 2, p. 129-134, 1995.

E

Eisenmenger MJ, Reyes-De-Corcuera JI. High pressure enhancement of enzymes: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 5, p. 331-347, 2009.

Ericsson DJ, Kasrayan A, Johansson P, Bergfors T, Sandström AG, Bäckvall JE, Mowbray SL. X-ray Structure of *Candida antarctica* Lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. **Journal of Molecular Biology**, v. 376, n. 1, p. 109-119, 2008.

F

Fiametti KG, Sychoski MM, De Cesaro A, Furigo Jr.A, Bretanha LC, Pereira CMP, Treichel H, de Oliveira D, Oliveir JV. Ultrasound irradiation promoted efficient solvent-free lipase-catalyzed production of mono- and diacylglycerols from olive oil. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 5, p. 981-987, 2011.

Francisco M, Van Den Bruinhorst A, Kroon MC. New natural and renewable low transition temperature mixtures (LTTMs): screening as solvents for lignocellulosic biomass processing. **Green Chemistry**, v. 14, n. 8, p. 2153-2157, 2012.

Francisco M, Van Den Bruinhorst A, Kroon MC. Low-Transition-Temperature Mixtures (LTTMs): A new generation of designer solvents. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 11, p. 3074-3085, 2013.

G

Ganske F, Bornscheuer UT. Lipase-catalyzed glucose fatty acid ester synthesis in ionic liquids. **Organic Letters**, v. 7, n. 14, p. 3097-3098, 2005.

Gao XG, Cao SG, Zhang KC. Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas* strain. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 1-2, p. 74-82, 2000.

García-Urdiales E, Rebolledo F, Gotor V. Kinetic Resolution of (\pm)-1-phenylbutan-1-ol by means of CALB-catalyzed aminolyses: A study on the role of the amine in the alcohol resolution. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 343, n. 6-7, p. 646-654, 2001.

Ghanem A. The utility of cyclodextrins in lipase-catalyzed transesterification in organic solvents: enhanced reaction rate and enantioselectivity. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 1, n. 8, p. 1282-1291, 2003.

Giraldo LJL, Laguerre M, Lecomte J, Figueroa-Espinoza MC, Pina M, Villeneuve P. Lipophilisation de composés phénoliques par voie enzymatique et propriétés antioxydantes des molécules lipophilisées. **OCL - Oleagineux, Corps Gras, Lipides**, v. 14, n. 1, p. 51-59, 2007.

Gore S, Baskaran S, Koenig B. Efficient synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2-ones in low melting tartaric acid-urea mixtures. **Green Chemistry**, v. 13, n. 4, p. 1009-1013, 2011.

Gore S, Baskaran S, Koenig B. Synthesis of Pyrimidopyrimidinediones in a deep eutectic reaction mixture. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 354, n. 13, p. 2368-2372, 2012.

Gorke JT, Kazlauskas RJ, Srien F. Enzymatic processing in deep eutectic solvents, **US PATENT**, N°20090117628, 2009.

Gorke JT, Srien F, Kazlauskas RJ. Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents. **Chemical Communications**, n. 10, p. 1235-1237, 2008.

Goujard L, Villeneuve P, Barea B, Lecomte J, Pina M, Claude S, Le Petit J, Ferré E. A spectrophotometric transesterification-based assay for lipases in organic solvent. **Analytical Biochemistry**, v. 385, n. 1, p. 161-167, 2009.

Guo W, Hou Y, Wu W, Ren S, Tian S, Marsh KN. Separation of phenol from model oils with quaternary ammonium salts via forming deep eutectic solvents. **Green Chemistry**, v. 15, n.1, p. 226-229, 2013.

Gutierrez MC, Ferrer ML, Mateo CR, Del Monte F. Freeze-drying of aqueous solutions of deep eutectic solvents: A suitable approach to deep eutectic suspensions of self-assembled structures. **Langmuir**, v. 25, n. 10, p. 5509-5515, 2009.

Guyot B, Bosquette B, Pina M, Graille J. Esterification of phenolic acids from green coffee with an immobilized lipase from *Candida antarctica* in solvent-free medium. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 6, p. 529-532, 1997.

H

Habulin M, Šabeder S, Paljevac M, Primožič M, Knez Z. Lipase-catalyzed esterification of citronellol with lauric acid in supercritical carbon dioxide/co-solvent media. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 43, n. 2, p. 199-203, 2007.

Halling P. Salt hydrates for water activity control with biocatalysts in organic media. **Biotechnology Techniques**, v. 6, n. 3, p. 271-276, 1992.

Hammond DA, Karel M, Klibanov AM, Krukonis VJ. Enzymatic reactions in supercritical gases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 11, n. 5, p. 393-400, 1985.

Hayyan M, Hashim MA, Al-Saadi MA, Hayyan A, Alnashef IM., Mirghani ME. Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents. **Chemosphere**, v. 93, n. 2, p. 455-464, 2013.

Hayyan M, Hashim MA, Hayyan A, Al-Saadi MA, AlNashef IM, Mirghani ME, Saheed OK. Are deep eutectic solvents benign or toxic? **Chemosphere**, v. 90, n. 7, p. 2193-2195, 2013.

Hayyan M, Mjalli FS, Hashim MA, AlNashef IM. A novel technique for separating glycerine from palm oil-based biodiesel using ionic liquids. **Fuel Processing Technology**, v. 91, n. 1, p. 116-120, 2010.

Hilal N, Kochkodan V, Nigmatullin R, Goncharuk V, Al-Khatib L. Lipase-immobilized biocatalytic membranes for enzymatic esterification: Comparison of various approaches to membrane preparation. **Journal of Membrane Science**, v. 268, n. 2, p. 198-207, 2006.

Hu S, Zhang Z, Zhou Y, Han B, Fan H, Li W, Song J, Xie Y. Conversion of fructose to 5-hydroxymethylfurfural using ionic liquids prepared from renewable materials. **Green Chemistry**, v. 10, n. 12, p. 1280-1283, 2008.

Hu S, Zhang Z, Zhou Y, Song J, Fan H, Han B. Direct conversion of inulin to 5-hydroxymethylfurfural in biorenewable ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 11, n. 6, p. 873-877, 2009.

Huang WY, Cai YZ, Zhang YB. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. **Nutrition and Cancer**, v. 62, n. 1, p. 1-20, 2009.

Humeau C, Girardin M, Rovel B, Miclo A. Enzymatic synthesis of fatty acid ascorbyl esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 5, n. 1-4, p. 19-23, 1998.

I

Ilgen F, König B. Organic reactions in low melting mixtures based on carbohydrates and l-carnitine-a comparison. **Green Chemistry**, v. 11, n. 6, p. 848-854, 2009a.

Ilgen F, Ott D, Kralisch D, Reil C, Palmberger A, König B. Conversion of carbohydrates into 5-hydroxymethylfurfural in highly concentrated low melting mixtures. **Green Chemistry**, v. 11, n. 12, p. 1948-1954, 2009b.

Imperato G, Eibler E, Niedermaier J, König B. Low-melting sugar-urea-salt mixtures as solvents for Diels-Alder reactions. **Chemical Communications**, n. 9, p. 1170-1172, 2005.

Imperato G, Höger S, Lenoir D, König B. Low melting sugar-urea-salt mixtures as solvents for organic reactions-estimation of polarity and use in catalysis. **Green Chemistry**, v. 8, n. 12, p. 1051-1055, 2006.

Itoh T, Takagi Y, Murakami T, Hiyama T, Tsukube H. Crown ethers as regulators of enzymatic reactions: enhanced reaction rate and enantioselectivity in lipase-catalyzed hydrolysis of 2-cyano-1-methylethyl acetate. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 61, n. 6, p. 2158-2163, 1996.

Ivanov AE, Schneider MP. Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 3, n. 6, p. 303-309, 1997.

I

Jastorff B, Mölter K, Behrend P, Bottin-Weber U, Filser J, Heimers A, Ondruschka B, Ranke J, Schaefer M, Schröder H, Stark A, Stepnowski P, Stock F, Störmann R, Stolte S, Welz-Biermann U, Ziegert S, Thöming J. Progress in evaluation of risk potential of ionic liquids-basis for an eco-design of sustainable products. **Green Chemistry**, v. 7, n. 5, p. 362-372, 2005.

Jastorff B, Störmann R, Ranke J, Mölter K, Stock F, Oberheitmann B, Hoffmann W, Hoffmann J, Nüchter M, Ondruschka B, Filser J. How hazardous are ionic liquids? Structure-activity relationships and biological testing as important elements for sustainability evaluation. **Green Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 136-142, 2003.

Jhang PC, Yang YC, Lai YC, Liu WR, Wang SL. A fully integrated nanotubular yellow-green phosphor from an environmentally friendly eutectic solvent. **Angewandte Chemie**, v. 121, n. 4, p. 756-759, 2009.

Johnathan TG, Friedrich S, Romas JK. Deep eutectic solvents for *candida antarctica* lipase B-catalyzed reactions. **American Chemical Society symposium series**, v.1038, n. 14, p.169-180, 2010.

K

Karboune S, St-Louis R, Kermasha S. Enzymatic synthesis of structured phenolic lipids by acidolysis of flaxseed oil with selected phenolic acids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 52, p. 96-105, 2008.

Kareem MA, Mjalli FS, Hashim MA, AlNashef IM. Phosphonium-based ionic liquids analogues and their physical properties. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 55, n. 11, p. 4632-4637, 2010.

Katsoura MH, Polydera AC, Tsironis LD, Petraki MP, Rajacić SK, Tselepis AD, Stamatis H. Efficient enzymatic preparation of hydroxycinnamates in ionic liquids enhances their antioxidant effect on lipoproteins oxidative modification. **New Biotechnology**, v. 26, n. 1-2, p. 83-91, 2009.

Kaur J, Wehtje E, Adlercreutz P, Chand S, Mattiasson B. Water transfer kinetics in a water activity control system designed for biocatalysis in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, n. 7, p. 496-501, 1997.

Khaled N, Montet N, Pina M, Graille J. Fructose oleate synthesis in a fixed catalyst bed reactor. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 3, p. 167-172, 1991.

Klibanov AM. Why are enzymes less active in organic solvents than in water? **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 97-101, 1997.

Klibanov AM. Improving enzymes by using them in organic solvents. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 241-246, 2001.

Knez Ž. Enzymatic reactions in dense gases. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, n. 3, p. 357-372, 2009.

Ku MA, Hang YD. Enzymatic synthesis of esters in organic medium with lipase from *Byssoschlamys fulva*. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 10, p. 1081-1084, 1995.

L

Laane C, Boeren S, Vos K, Veeger C. Rules for optimization of biocatalysis in organic-solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n. 1, p. 81-87, 1987.

Laguerre M, Giraldo LJL, Lecomte J, Figueroa-Espinoza MC, Baréa B, Weiss J, Decker EA, Villeneuve P. Relationship between hydrophobicity and antioxidant ability of "phenolipids" in emulsion: A parabolic effect of the chain length of rosmarinate esters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 5, p. 2869-2876, 2010.

Lau RM, Sorgedraeger MJ, Carrea G, Rantwijk FV, Secundo F, Sheldon RA. Dissolution of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids: effects on structure and activity. **Green Chemistry**, v. 6, n. 9, p. 483-487, 2004.

Lee SH, Ha SH, Hiep NM, Chang WJ, Koo YM. Lipase-catalyzed synthesis of glucose fatty acid ester using ionic liquids mixtures. **Journal of Biotechnology**, v. 133, n. 4, p. 486-489, 2008.

Lee SH, Nguyen HM, Koo YM, Ha SH. Ultrasound-enhanced lipase activity in the synthesis of sugar ester using ionic liquids. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 9, p. 1009-1012, 2008.

Leron RB, Li MH. Molar heat capacities of choline chloride-based deep eutectic solvents and their binary mixtures with water. **Thermochimica Acta**, v. 530, p. 52-57, 2012.

Leron RB, Wong DSH, Li MH. Densities of a deep eutectic solvent based on choline chloride and glycerol and its aqueous mixtures at elevated pressures. **Fluid Phase Equilibria**, v. 335, p. 32-38, 2012.

Li W, Zhang Z, Han B, Hu S, Song J, Xie Y, Zhou X. Switching the basicity of ionic liquids by CO₂. **Green Chemistry**, v. 10, n. 11, p. 1142-1145, 2008.

Li X, Hou M, Han B, Wang X, Zou L. Solubility of CO₂ in a choline chloride + urea eutectic mixture. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 53, n. 2, p. 548-550, 2008.

Liao JH, Wu PC, Bai YH. Eutectic mixture of choline chloride/urea as a green solvent in synthesis of a coordination polymer: $\text{Zn}(\text{O}_3\text{PCH}_2\text{CO}_2)]\text{NH}_4$. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 8, n. 4, p. 390-392, 2005.

Lima VMG, Krieger N, Mitchell DA, Fontana JD. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, n. 1, p. 65-71, 2004.

Lin G, Lin WY. Microwave-promoted lipase-catalyzed reactions. **Tetrahedron Letters**, v. 39, n. 24, p. 4333-4336, 1998.

Lin G, Liu HC. Ultrasound-promoted lipase-catalyzed reactions. **Tetrahedron Letters**, v. 36, n. 34, p. 6067-6068, 1995.

Lin Z, Wragg DS, Lightfoot P, Morris RE. A novel non-centrosymmetric metallophosphate-borate compound via ionothermal synthesis. **Dalton Transactions**, n. 27, p. 5287-5289, 2009.

Lindberg D, Revenga MD, Widersten M. Deep eutectic solvents (DESs) are viable cosolvents for enzyme-catalyzed epoxide hydrolysis. **Journal of Biotechnology**, v. 147, n. 3, p. 169-171, 2010.

Liu B, Zhao J, Wei F. Characterization of caprolactam based eutectic ionic liquids and their application in SO_2 absorption. **Journal of Molecular Liquids**, v. 180, p. 19-25, 2013.

Liu L, Li Y, Wei H, Dong M, Wang J, Slawin AMZ, Li J, Dong J, Morris RE. Ionothermal Synthesis of Zirconium Phosphates and Their Catalytic Behavior in the Selective Oxidation of Cyclohexane. **Angewandte Chemie**, v. 121, n. 12, p. 2240-2243, 2009a.

Liu L, Wragg DS, Zhang H, Kong Y, Byrne PJ, Prior TJ, Warren JE, Lin Z, Dong J, Morris RE. Ionothermal synthesis, structure and characterization of three-dimensional zinc phosphates. **Dalton Transactions**, n. 34, p. 6715-6718, 2009b.

Liu QP, Hou XD, Li N, Zong MH. Ionic liquids from renewable biomaterials: synthesis, characterization and application in the pretreatment of biomass. **Green Chemistry**, v. 14, n. 2, p. 304-307, 2012.

Ljunger G, Adlercreutz P, Mattiasson B. Lipase catalyzed acylation of glucose. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 11, p. 1167-1172, 1994.

Lozano P. Enzymes in neoteric solvents: From one-phase to multiphase systems. **Green Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 555-569, 2010.

Lozano P, De Diego T, Larnicol M, Vaultier M, Iborra JL. Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of rac-1-phenylethanol in ionic liquids and ionic liquids/supercritical carbon dioxide systems. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 19, p. 1559-1565, 2006.

M

Maase M, Massonne K. Biphasic Acid Scavenging Utilizing Ionic Liquids: The First Commercial Process with Ionic Liquids. **Ionic Liquids IIIB: Fundamentals, Progress, Challenges, and Opportunities**, v.902, chap. 10, p.126-132, 2005.

Magna L, Chauvin Y, Niccolai GP, Basset JM. The Importance of Imidazolium Substituents in the Use of Imidazolium-Based Room-Temperature Ionic Liquids as Solvents for Palladium-Catalyzed Telomerization of Butadiene with Methanol. **Organometallics**, v. 22, n. 22, p. 4418-4425, 2003.

Mamajanov I, Engelhart AE, Bean HD, Hud NV. DNA and RNA in Anhydrous Media: Duplex, Triplex, and G-Quadruplex Secondary Structures in a Deep Eutectic Solvent. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 49, n. 36, p. 6310-6314, 2010.

Maugeri Z, Dominguez De Maria P. Novel choline-chloride-based deep-eutectic-solvents with renewable hydrogen bond donors: levulinic acid and sugar-based polyols. **RSC Advances**, v. 2, n. 2, p. 421-425, 2012.

Maugeri Z, Leitner W, Domínguez De María P. Chymotrypsin-Catalyzed Peptide Synthesis in Deep Eutectic Solvents. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2013, n. 20, p. 4223-4228, 2013.

Miled N, De Caro A, De Caro J, Verger RA. conformational transition between an open and closed form of human pancreatic lipase revealed by a monoclonal antibody. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1476, n. 2, p. 165-172, 2000.

Morrison HG, Sun CC, Neervannan S. Characterization of thermal behavior of deep eutectic solvents and their potential as drug solubilization vehicles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 378, n. 1-2, p. 136-139, 2009.

Mutua L, Akoh C. Synthesis of alkyl glycoside fatty acid esters in non-aqueous media by *Candida* sp. lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 70, n. 1, p. 43-46, 1993.

N

Niklas Öhrner MM, Anders M, Torbjörn N, Karl H. Thioethyl-, Vinyl-, Ethyl Octanoate Esters and Octanoic Acid as Acyl Donors in Lipase Catalysed Acyl Transfer Reactions. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 9, n. 1-4, p. 105-114, 1994.

Noda A, Hayamizu K, Watanabe M. Pulsed-Gradient Spin-Echo ¹H and ¹⁹F NMR Ionic Diffusion Coefficient, Viscosity, and Ionic Conductivity of Non-Chloroaluminate Room-Temperature Ionic Liquids. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, n. 20, p. 4603-4610, 2001.

O

Olivier-Bourbigou H, Favre F, Forestière A, Hugues F. Ionic Liquids and Catalysis: the IFP Biphasic Difasol Process. **Handbook of Green Chemistry**: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Part. 1, 2010.

Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken SM, Harel M, Remington SJ, Silman I, Schrag J. The α/β hydrolase fold. **Protein Engineering**, v. 5, n. 3, p. 197-211, 1992.

P

Pang K, Hou Y, Wu W, Guo W, Penga W, Marsh KN. Efficient separation of phenols from oils via forming deep eutectic solvents. **Green Chemistry**, v. 14, n. 9, p. 2398-2401, 2012.

Pang N, Gu SS, Wang J, Cui HS, Wang FQ, Liu X, Zhao XY, Wu FA. A novel chemoenzymatic synthesis of propyl caffeate using lipase-catalyzed transesterification in ionic liquid. **Bioresource Technology**, v. 139, p. 337-342, 2013.

Pawar PM, Jarag KJ, Shankarling GS. Environmentally benign and energy efficient methodology for condensation: an interesting facet to the classical Perkin reaction. **Green Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 2130-2134, 2011.

Petersson AEV, Adlercreutz P, Mattiasson B. A water activity control system for enzymatic reactions in organic media. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 2, p. 235-241, 2007.

Phadtare SB, Shankarling GS. Halogenation reactions in biodegradable solvent: Efficient bromination of substituted 1-aminoanthra-9,10-quinone in deep eutectic solvent (choline chloride : urea). **Green Chemistry**, v. 12, n. 3, p. 458-462, 2010.

Pimentel MCB, Krieger N, Coelho LCCB, Fontana JO, Melo EHM, Ledingham WM, Lima Filho JL. Lipase from a Brazilian strain of *Penicillium citrinum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 49, n. 1, p. 59-74, 1994.

R

Ramsey E, Qiubai S, Zhang Z, Zhang C, Gou W. Mini-Review: Green sustainable processes using supercritical fluid carbon dioxide. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, n. 6, p. 720-726, 2009.

Ranke J, Mölter K, Stock F, Bottin-Weber U, Poczubutt J, Hoffmann J, Ondruschka B, Filser J, Jastorff B. Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 58, n. 3, p. 396-404, 2004.

Ranke J, Müller A, Bottin-Weber U, Stock F, Stolte S, Arning J, Störmann R, Jastorff B. Lipophilicity parameters for ionic liquid cations and their correlation to in vitro cytotoxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, n. 3, p. 430-438, 2007.

Rimsza JM, Corrales LR. Adsorption complexes of copper and copper oxide in the deep eutectic solvent 2:1 urea-choline chloride. **Computational and Theoretical Chemistry**, v. 987, p. 57-61, 2012.

Romero MD, Calvo L, Alba C, Habulin M, Primožič M, Knez Z. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, n. 1, p. 77-84, 2005.

S

Sabally K, Karboune S, St-Louis R, Kermasha S. Lipase-catalyzed transesterification of trilinolein or trilinolenin with selected phenolic acids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 83, n. 2, p. 101-107, 2006.

Secundo F, Barletta GL, Dumitriu E, Carrea G. Can an inactivating agent increase enzyme activity in organic solvent? Effects of 18-crown-6 on lipase activity, enantioselectivity, and conformation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 1, p. 12-18, 2007.

Seddon KR, Stark A, Torres MJ. Influence of chloride, water, and organic solvents on the physical properties of ionic liquids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 72, n. 12, p. 2275-2287, 2000.

Serrano MC, Gutiérrez MC, Jiménez R, Ferrer ML, Del Monte F. Synthesis of novel lidocaine-releasing poly(diols-co-citrate) elastomers by using deep eutectic solvents. **Chemical communications (Cambridge, England)**, v. 48, n. 4, p. 579-81, 2011.

Shahbaz K, Baroutian S, Mjalli FS, Hashim MA, AlNashef IM. Prediction of glycerol removal from biodiesel using ammonium and phosphonium based deep eutectic solvents using artificial intelligence techniques. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 118, p. 193-199, 2012.

Shahbaz K, Mjalli FS, Hashim MA, AlNashef IM. Using deep eutectic solvents based on methyl triphenyl phosphonium bromide for the removal of glycerol from palm-oil-based biodiesel. **Energy & Fuels**, v. 25, n. 6, p. 2671-2678, 2011.

Shahbaz K, Mjalli FS, Hashim MA, AlNashef IM. Eutectic solvents for the removal of residual palm oil-based biodiesel catalyst. **Separation and Purification Technology**, v. 81, n. 2, p. 216-222, 2011.

Shu CH, Xu CJ, Lin GC. Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 734-738, 2006.

Singh B, Lobo H, Shankarling G. Selective n-alkylation of aromatic primary amines catalyzed by bio-catalyst or deep eutectic solvent. **Catalysis Letters**, v. 141, n. 1, p. 178-182, 2011.

Sonawane YA, Phadtare SB, Borse BN, Jagtap AR, Shankarling GS. Synthesis of diphenylamine-based novel fluorescent styryl colorants by Knoevenagel condensation using a conventional method, biocatalyst, and deep eutectic solvent. **Organic Letters**, v. 12, n. 7, p. 1456-1459, 2010.

Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 579, n. 1-2, p. 200-213, 2005.

Spencer KC. **Method of improving lipase activity using noble gases**: Patent US5364777 A 1992.

Stamatis H, Sereti V, Kolisis FN. Enzymatic synthesis of hydrophilic and hydrophobic derivatives of natural phenolic acids in organic media. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 11, n. 4-6, p. 323-328, 2001.

Stolte S, Arning J, Bottin-Weber U, Matzke M, Stock F, Thiele K, Uerdingen M, Welz-Biermann U, Jastorff B, Ranke J. Anion effects on the cytotoxicity of ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 8, n. 7, p. 621-629, 2006.

Su WC, Wong DSH, Li MH. Effect of Water on Solubility of Carbon Dioxide in (Aminomethanamide+2-Hydroxy-N,N,N-trimethylethanaminium Chloride). **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 54, n. 6, p. 1951-1955, 2009.

Sun S., Qin F., Bi Y., Chen J., Yang G., Liu W. Enhanced transesterification of ethyl ferulate with glycerol for preparing glyceryl diferulate using a lipase in ionic liquids as reaction medium. **Biotechnology Letters**, v. 35, n. 9, p. 1449-1454, 2013.

Svensson I, Wehtje E, Adlercreutz P, Mattiasson B. Effects of water activity on reaction rates and equilibrium positions in enzymatic esterifications. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, n. 5, p. 549-556, 1994.

T

Takagi Y, Teramoto J, Kihara H, Itoh T, Tsukube H. Thiacyclopentane ether as regulator of lipase-catalyzed trans-esterification in organic media: Practical optical resolution of allyl alcohols. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 28, p. 4991-4992, 1996.

Tan T, Lu J, Nie K, Deng L, Wang F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 5, p. 628-634, 2010.

Therisod M, Klivanov AM. Facile enzymatic preparation of monoacylated sugars in pyridine. **Journal of the American Chemical Society**, v. 108, n. 18, p. 5638-5640, 1986.

Thielmann Y, Sorensen MC, Kang IJ, Pfromm PH, Czermak P. Catalytic properties of *Candida antarctica* lipase B clusters solubilized in hexane. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 27, n. 2, p. 152-158, 2009.

Thuy pham TP, Cho CW, Yun YS. Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review. **Water Research**, v. 44, n. 2, p. 352-372, 2010.

Triolo A, Russina O, Bleif HJ, Di Cola E. Nanoscale segregation in room temperature ionic liquids. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 18, p. 4641-4644, 2007.

U

Uppenberg J, Hansen MT, Patkar S, Jones TA. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure**, v. 2, n. 4, p. 293-308, 1994.

Uppenberg J, Patkar S, Bergfors T, Jones TA. Crystallization and Preliminary X-ray Studies of Lipase B from *Candida antarctica*. **Journal of Molecular Biology**, v. 235, n. 2, p. 790-792, 1994.

V

Valivety RH, Halling PJ, Peilow AD, Macrae AR. Lipases from different sources vary widely in dependence of catalytic activity on water activity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1122, n. 2, p. 143-146, 1992.

Valivety RH, Halling PJ, Peilow AD, Macrae AR. Relationship between water activity and catalytic activity of lipases in organic media. **European Journal of Biochemistry**, v. 222, n. 2, p. 461-466, 1994.

Van Rantwijk F, Madeira Lau R, Sheldon RA. Biocatalytic transformations in ionic liquids. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 131-138, 2003.

Vanden BW. Epigenetic impact of dietary polyphenols in cancer chemoprevention: Lifelong remodeling of our epigenomes. **Pharmacological Research**, v. 65, n. 6, p. 565-576, 2012.

Ventura SP, Marques CS, Rosatella AA, Afonso CA, Gonçalves F, Coutinho JA. Toxicity assessment of various ionic liquid families towards *Vibrio fischeri* marine bacteria. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, n. 1, p. 162-168, 2012.

Verger R. 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 32-38, 1997.

Villeneuve P. Lipases in lipophilization reactions. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 6, p. 515-536, 2007.

Villeneuve P, Hills G, Bachain P, Pina M, Caro Y, Baréa B, Guyot B, Grüning B, Graille J. Lipase-catalyzed synthesis of quinate and glucuronate fatty esters. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 104, n. 7, p. 394-401, 2002.

Villeneuve P, Muderhwa JM, Graille J, Haas MJ. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, n. 4, p. 113-148, 2000.

W

Wehtje E, Adlercreutz P. Lipases have similar water activity profiles in different reactions. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 6, p. 537-540, 1997.

Wehtje E, Kaur J, Adlercreutz P, Chand S, Mattiasson B. Water activity control in enzymatic esterification processes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, n. 7, p. 502-510, 1997.

Weitkamp P, Vosmann K, Weber N. Highly Efficient Preparation of Lipophilic Hydroxycinnamates by Solvent-free Lipase-Catalyzed Transesterification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 19, p. 7062-7068, 2006.

Won K, Lee S. On-line conversion estimation for solvent-free enzymatic esterification systems with water activity control. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 7, n. 2, p. 76-84, 2002.

Wu SH, Caparanga AR, Leron RB, Li MH. Vapor pressure of aqueous choline chloride-based deep eutectic solvents (ethaline, glyceline, maline and reline) at 30–70°C. **Thermochimica Acta**, v. 544, p. 1-5, 2012.

X

Xu Y, Nordblad M, Nielsen PM, Brask J, Woodley JM. In situ visualization and effect of glycerol in lipase-catalyzed ethanolysis of rapeseed oil. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 72, n. 3-4, p. 213-219, 2011.

Y

Yan Y, Bornscheuer UT, Schmid R. Lipase-catalyzed synthesis of vitamin C fatty acid esters. **Biotechnology Letters**, v. 21, n. 12, p. 1051-1054, 1999.

Yang Z, Guo Z, Xu X. Enzymatic lipophilisation of phenolic acids through esterification with fatty alcohols in organic solvents. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1311-1315, 2012.

Yang Z, Guo Z, Xu X. Ionic Liquid-Assisted Solubilization for Improved Enzymatic Esterification of Phenolic Acids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 6, p. 1049-1055, 2012.

Yasmin T, Jiang T, Han B, Zhang J, Ma X. Transesterification reaction catalysed by Novozym 435 in supercritical carbon dioxide. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 41, n. 1-2, p. 27-31, 2006.

Yori JC, D'Ippolito SA, Pieck CL, Vera CR. Deglycerolization of Biodiesel Streams by Adsorption Over Silica Beds. **Energy & Fuels**, v. 21, n. 1, p. 347-353, 2007.

Z

Zeng SH, Yang JK, Yan YJ. Studies on stability of immobilized lipase and its application. **Chinese Journal of Bioprocess Engineering**. n. 1, p. 45-49, 2007.

Zhang Q, Karine De Oliveira V, Royer S, Jérôme F. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 21, p. 7108-7146, 2012.

Zhao C, Ren J, Qu X. G-Quadruplexes Form Ultrastable Parallel Structures in Deep Eutectic Solvent. **Langmuir**, v. 29, n. 4, p. 1183-1191, 2013.

Zhao D, Liao Y, Zhang Z. Toxicity of Ionic Liquids. **CLEAN - Soil, Air, Water**, v. 35, n. 1, p. 42-48, 2007.

Zhao H, Baker GA, Holmes S. New eutectic ionic liquids for lipase activation and enzymatic preparation of biodiesel. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 9, n. 6, p. 1908-1916, 2011.

Zhao H, Baker GA, Holmes S. Protease activation in glycerol-based deep eutectic solvents. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 72, n. 3-4, p. 163-167, 2011.

Zhao H, Zhang C, Crittle TD. Choline-based deep eutectic solvents for enzymatic preparation of biodiesel from soybean oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85, p. 243-247, 2013.